

ISSN-2007-8080

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 35, NÚMERO 3, Septiembre 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, LANREF, 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

Dra. Graciela Ávila Quezada, UACH.

Dra. María de Jesús Yañez Morales, COLPOS.

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN.

Dra. Rosa Navarrete Maya, UNAM.

Dr. Elías Hernández Castro, UAG.

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS.

Dr. Hernán García Ruíz, UNL, USA.

Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Instituto Tecnológico de Conkal.

Dr. Jesús Gaudencio Aquino Martínez, ICAMEX.

Dr. José Alfredo Samaniego Gaxiola, INIFAP.

Dr. José Luciano Morales García, UMSNH.

Dr. José Abel López Buenfil, CNRF-DGSV.

Dr. Luis Pérez Moreno, UGTO.

Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez, UASLP-CONACYT.

Dr. Rómulo García Velasco, UAEM.

Portada: Patogenicidad de cepas de mucorales en frutos de papaya Maradol.

Original: Raúl Allende Molar/Pág. 397-417.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

- Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions** * Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero. 360
Peñuelas-Rubio O, Arellano-Gil M, Verdugo-Fuentes AA, Chaparro-Encinas LA, Hernández-Rodríguez SE, Martínez-Carrillo JL, Vargas-Arispuro IC.
- Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, Mexico** * Detección, identificación e inferencia filogenética del nematodo del tallo *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) afectando alfalfa *Medicago sativa* L. en Jalisco, México. 377
Rosas-Hernández L, Ramírez-Suárez A, Alcasio-Rangel S, López-Buenfil JA, Medina-Gómez E.
- Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.) fruit in Mexico** * Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México. 397
Cruz-Lachica I, Márquez-Zequera I, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Allende-Molar R.
- Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru** * Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú. 418
Quispe-Apaza CS, Mansilla-Samaniego RC, López-Bonilla CF, Espejo-Joya R, Villanueva-Caceda J, Monzón C.
- Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico** * Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México. 437
Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñoz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE, Fernández-Pavía SP.
- Dieback disease of *Prunus* sp. associated to *Armillaria* spp. in commercial orchards in Michoacan, Mexico** * Muerte descendente de *Prunus* sp. asociada a *Armillaria* spp. en huertas comerciales de Michoacán, México. 463
Rivas-Valencia P, Almaraz-Sánchez A, Cano-Salgado A, Hernández-Ramos L, Alanís-Martínez I, Fernández-Montes MR.
- Etiology of rotting of gladiolus corms in storage in Cuautla, Morelos, Mexico** * Etiología de la pudrición de cormos de gladiolo en almacén en Cuautla Morelos, México. 476
Hernández-Moreno AM, Bautista-Baños S, Hernández-López M, Barrera-Necha LL, León-Rodríguez R, García-Barrera L.

Reduction in the incidence of grey mold in table grapes due to the volatile effect of a garlic extract * Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto de volátiles de un extracto de ajo. 494
Campa-Siqueiros P, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C, Martínez-Téllez MA, Vargas-Arispuro I, Ávila-Quezada G.

Techniques for isolation, identification and molecular characterization of Moko disease-related *Ralstonia solanacearum* strains * Técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de *Ralstonia solanacearum* relacionadas a Moko del plátano. 509
Obrador-Sánchez JA, Tzec-Simá M, Canto-Canché B, Higuera-Ciajara I.

Genetic resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in selected maize (*Zea mays* L.) lines with white and yellow endosperm * Resistencia genética a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en líneas seleccionadas de maíz (*Zea mays* L.) con endospermo blanco y amarillo. 534
Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C, Solano-Báez AR.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN * REVIEW ARTICLES

Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control * Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. 549
Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R.

Vasconcellea cauliflora* resistance to *Papaya ringspot potyvirus* (PRSV-P) and its introgression in *Carica papaya * Resistencia de *Vasconcellea cauliflora* al *Virus de la mancha anular de la papaya-potyvirus* (PRSV-P) y su introgresión en *Carica papaya*. 571
Ordaz-Pérez D, Gámez-Vázquez J, Hernández-Ruiz J, Espinosa-Trujillo E, Rivas-Valencia P, Castro-Montes I.

Evolution of diagnostic technics for plant viruses * Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. 591
González-Garza R.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

In vitro* evaluation of extracts from the *Lilium* genus to control *Fusarium oxysporum * Evaluación *in vitro* de extractos del género *Lilium* para el control de *Fusarium oxysporum*. 611
Iturbide-Zuñiga AS, Colinas-León MTB, Lozoya-Saldaña H, Medina-Moreno SA, Ayala-Arreola J.

***Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions**

Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero

Ofelda Peñuelas-Rubio, Maritza Arellano-Gil*, Abel Alberto Verdugo-Fuentes, Luis Abraham Chaparro-Encinas, Sharon Elena Hernández-Rodríguez, José Luis Martínez-Carrillo, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 sur, Ciudad Obregón, Sonora, CP. 85000, México; Irasema del Carmen Vargas-Arispuro, Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., km 0.6 Carretera Hermosillo-La Victoria, Hermosillo, Sonora, CP. 83000 México. *Autor para correspondencia: maritza.arellano@itson.edu.mx.

Recibido: 10 de Marzo, 2017.

Aceptado: 02 de Mayo, 2017.

Peñuelas-Rubio O, Arellano-Gil M, Verdugo-Fuentes AA, Chaparro-Encinas LA, Hernández-Rodríguez SE, Martínez-Carrillo JL, Vargas-Arispuro IC. 2017. *Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 360-376.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-3

Primera publicación DOI: 09 de Junio, 2017.

First DOI publication: June 09, 2017.

Resumen. Se evaluó la capacidad antifúngica de extractos de *Larrea tridentata* en la inhibición de *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* bajo condiciones experimentales en invernadero. Una vez que la cepa de *Fusarium* se caracterizó, se determinó el crecimiento micelial *in vitro* y su efecto inhibitorio con los extractos de *L. tridentata* por el

Abstract. The antifungal ability of extracts of *Larrea tridentata* in the inhibition of *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* *in vitro* and *in vivo* was evaluated. Once the *Fusarium* strain was characterized, the methodology of poisoned culture medium was used to determine the inhibition of mycelial growth at various concentrations (0-2000 ppm) and solvents (dichloromethane, methanol, ethanol and water). In the *in vivo* assay, ten treatments were evaluated: 2000 and 3000 ppm for DCM and EtOH, 3000 and 6000 ppm for MeOH and H₂O and two controls; one plant as experimental unit and ten replicates. Plant height, leaf number, chlorophyll, severity, as well as incidence and survival were determined in tomato plants inoculated with the fungus and different extracts of *L. tridentata*. The extracts with a higher percentage of inhibition and vegetative development are dichloromethane at 3000 ppm and methanol at 4000 ppm, both *in vitro* and *in vivo*. Extracts of *Larrea tridentata* can be

método del medio envenenado a diferentes concentraciones (0-2000 ppm) y disolventes (diclorometano, metanol, etanol y agua). En el ensayo *in vivo* se evaluaron diez tratamientos: 2000 y 3000 ppm para DCM y EtOH, 3000 y 6000 ppm para MeOH y H₂O y dos testigos, considerando una planta como unidad experimental y diez repeticiones. Se evaluó la altura de la planta, número de hojas, clorofila, severidad, incidencia y sobrevivencia en plantas de tomate inoculadas con el hongo y tratadas con los diferentes extractos de *L. tridentata*. Los extractos con mayor porcentaje de inhibición y desarrollo vegetativo fueron: diclorometano a 3000 ppm y metanol a 4000 ppm, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los extractos de *L. tridentata* pueden considerarse dentro de un plan de manejo integrado para el control de la pudrición de la corona en tomate causada por *F. oxysporum radialis-lycopersici*.

Palabras clave: biofungicida; agricultura protegida; manejo integrado; gobernadora.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) se cultiva por excelencia en agricultura protegida en México, consolidando al país como el exportador número uno a Estados Unidos y Canadá (Atlas Agroalimentario, 2016). Entre los principales problemas que enfrenta el cultivo, se encuentra la aparición de enfermedades de origen fúngico, como la pudrición de la corona del tomate (PCT) cuyo agente causal es el hongo saprófito *Fusarium oxysporum* f. sp. *radialis-lycopersici* (Forl). La PCT es una de las enfermedades más destructivas, ya que ocasiona pérdidas en el rendimiento de sistemas de producción de invernadero y campo abierto (Szczuchura *et al.*, 2013). Entre los daños que causan a las plantas destacan el retraso en el crecimiento, la pudrición radical y lesiones necróticas extensas en el cuello y base del tallo y por consiguiente la senescencia

considered as part of an integrated management plan for the control of crown rot in tomatoes caused by *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici*.

Key words: biofungicide, protected agriculture, integrated management, *Creosote bush*.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is grown par excellence in protected agriculture in Mexico, consolidating this country as the main exporter to the United States and Canada (Atlas Agroalimentario, 2016). Among the main problems faced by this crop is the appearance of fungal diseases, such as Tomato Crown Rot (TCR), the causal agent of which is the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radialis-lycopersici* (Forl). TCR is one of the most destructive diseases, since it causes losses in the yields of greenhouse and field production systems (Szczuchura *et al.*, 2013). Some of the most important damages caused to plants include growth delay, root rotting, large necrotic wounds in the neck and base of the stem, and therefore senescence (McGovern, 2015). The presence of Forl has been reported in the states of Morelos (Domínguez, 2012) and Sinaloa, where its presence caused losses of up to 50 % in tomato harvests (Apodaca *et al.*, 2004). Conventional control strategies are based on the use of grafts, solarization, crop rotation, and mainly, on the use of synthetic chemical products, which produce well-known damages to human health, negative impacts on the environment and the considerable increase of production costs (Cordero-Ramírez *et al.*, 2013). Given the negative implications of the improper use of chemical fungicides, the development of new forms of control is crucial to reduce the dependence on these products (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Some of the alternatives to chemical control in integrated pest and disease

(McGovern, 2015). La presencia de Forl ha sido reportada en los estados de Morelos (Domínguez, 2012) y Sinaloa, donde su presencia causó hasta un 50 % de reducción de la cosecha del tomate (Apo-daca *et al.*, 2004). Las estrategias convencionales de control están basadas en el uso de injertos, solarización, rotación de cultivos y principalmente en el uso de productos químicos sintéticos, de los cuales son conocidos los riesgos a la salud humana, el impacto negativo en el medio ambiente y el aumento considerable de los costos de producción (Cordero-Ramírez *et al.*, 2013). Dadas las implicaciones negativas del uso inadecuado de fungicidas químicos, es primordial el desarrollo de nuevas formas de control para reducir la dependencia a dichos productos (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Dentro de las alternativas al control químico en un manejo integrado de plagas y enfermedades, se encuentra el uso de extractos vegetales con propiedades fungicidas, como *Larrea tridentata*. Comúnmente conocida como “gobernadora” es el arbusto dominante del desierto Sonorense y una fuente notable de compuestos naturales con aproximadamente el 50% de las hojas (en peso seco) como materia extraíble (Arteaga *et al.*, 2005). Entre los compuestos fenólicos bioactivos más estudiados destaca el ácido nordihidroguaiarético (ANDG) (Martins *et al.*, 2013) antioxidante que se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidérmicas de las hojas y tallos. Dicho biocompuesto se encuentra presente en todas las especies del género, además, estudios interpopulacionales de *L. tridentata* realizados en el desierto Sonorense revelaron que las concentraciones de ANDG encontradas en la resina de sus hojas variaron en función de la latitud y de la época del año. Las flores, las hojas, los tallos verdes y algunos leñosos (<5 mm de diámetro) contienen ANDG, la concentración más alta se observó en las hojas con 38.3 mg g⁻¹ y tallos verdes con 32.5 mg g⁻¹ (Hyder, *et al.*, 2002; Lira-Saldivar, 2003). Por lo

management, are the use of plant extracts with fungicidal properties, such as *Larrea tridentata*. Commonly known as “gobernadora,” it is the predominant bush of the Sonoran desert and a prominent source of natural compounds with about 50 % of its leaves (in dry weight) as extractable matter (Arteaga *et al.*, 2005). Out of the most widely studied bioactive phenolic compounds, one worth highlighting is nordihydroguaiaric acid (NDGA) (Martins *et al.*, 2013), an antioxidant found in the resin of cells near the epidemic layers of leaves and stems. This biocompound is present in all the species of the genus; also, interpopulational studies on *L. tridentata* carried out in the Sonora desert revealed that the NDGA concentrations found in the resin of their leaves varied depending on the latitude and time of year. The flowers, leaves, green and some woody stems (<5 mm diameter) contain NDGA; the highest concentration was observed in leaves with 38.3 mg g⁻¹ and green stems with 32.5 mg g⁻¹ (Hyder, *et al.*, 2002; Lira-Saldivar, 2003). Therefore, knowing the content of NDGA in the *L. tridentata* extracts will provide information on its effect in the control of pathogenic fungi in plants. The antifungal properties of *L. tridentata* have been confirmed in different investigations for about 40 years using *in vitro* tests with about 17 important plant pathogenic fungi in the agricultural area (López *et al.*, 2005; Lira-Saldivar *et al.*, 2006); however, there are very few studies *in vitro* against Forl, and carrying out a test under these conditions would set the standards to test the standards *in vivo*, since, despite the promising results that have been published, the evidence of tests carried out in greenhouses or fields is insufficient. The aim of this study was to quantify the content of NDGA in de *L. tridentata* extracts to evaluate its effectiveness *in vitro* and in greenhouse conditions to establish its potential as a biofungicide in the control of Forl.

que, conocer el contenido de ANDG en los extractos de *L. tridentata* brindará información sobre su efecto en el control de hongos fitopatógenos. Las propiedades antifúngicas de *L. tridentata* han sido corroboradas con trabajos desde hace aproximadamente 40 años mediante ensayos *in vitro* con al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia en el área agrícola (López *et al.*, 2005; Lira-Saldivar *et al.*, 2006); sin embargo, son escasos los estudios *in vitro* contra Forl y realizar un ensayo bajo estas condiciones, marcaría la pauta para probar los extractos en condiciones *in vivo*, ya que a pesar de los resultados prometedores que se han publicado, la evidencia que se tiene de ensayos en invernadero o campo es insuficiente. El objetivo del presente estudio fue cuantificar el contenido de NDGA en extractos de *L. tridentata* para evaluar su efectividad *in vitro* y bajo condiciones de invernadero para establecer su potencial como biofungicida en el control de Forl.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el año de 2014 en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y el Centro Experimental de Transferencia y Tecnología 910 del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) en Ciudad Obregón, Sonora, así como en el laboratorio de Ecología Química del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) A.C. en Hermosillo, Sonora.

Obtención de la cepa de Forl

La cepa de Forl, se aisló previamente de la rizósfera de plantas de tomate cultivadas en un invernadero comercial del Valle del Yaqui, Sonora. El hongo se caracterizó por comparación de sus características coloniales y morfológicas mediante

MATERIALS AND METHODS

This investigation was carried out in the year 2014 in the Plant Biotechnology laboratory and in the Experimental Transfer and Technology Center 910 of the Sonora Institute of Technology (ITSON) in Ciudad Obregón, Sonora, as well as the Ecological Chemistry laboratory in the Food and Development Research Center (CIAD) A.C. Hermosillo, Sonora.

Obtaining the Forl strain

The Forl strain was previously isolated from the rhizosphere of tomato plants grown in a commercial greenhouse in the Yaqui Valley, Sonora. The fungus was distinguished by comparing its colonial and morphological characteristics using specialized literature (Leslie and Summerell, 2016; Nelson *et al.*, 1983), which was identified molecularly with specific primers according to Hirano and Arie (2006) (data not published). A copy of the isolation is kept as Forl_{mx-19} in the microorganism bank of the Ecological Chemistry Lab in the microorganism bank of the Ecological Chemistry Lab in the Research Center for Food and Development, Civil Association (CIAD A.C.), Hermosillo, Sonora.

Obtaining *L. tridentata* extracts and content of nordihydroguaiaretic acid (NDGA).

Preparation of the extracts. Extracts were produced using four solvents: dichloromethane (DCM), methanol (MeOH), ethanol (EtOH), and water (H₂O) using young *L. tridentata* leaf and stem samples from the Sonora desert (Peñuelas *et al.*, 2015). For the DCM and MeOH extracts, 90 g of dry and crushed *L. tridentata* leaves were used for separate extractions, with each solvent in a Soxhlet system at 39 and 64.7 °C, respectively, for

el uso de literatura especializada (Leslie and Summerell, 2016; Nelson *et al.*, 1983) el cual se identificó molecularmente con primers específicos según Hirano y Arie (2006) (datos no publicados). Una copia del aislado se encuentra resguardada como Forl_{mx}-19 en el banco de microorganismos del laboratorio de Ecología Química del CIAD A.C. Hermosillo, Sonora.

Obtención de extractos de *L. tridentata* y contenido de ácido nordihidroguayarático (ANDG).

Preparación de los extractos. Se elaboraron extractos con cuatro disolventes: diclorometano (DCM), metanol (MeOH), etanol (EtOH) y agua (H₂O) a partir de muestras de hojas y tallos jóvenes de *L. tridentata* del desierto Sonorense (Peñuelas *et al.*, 2015). Para los extractos de DCM y MeOH, se partió de 90 g de hojas secas y pulverizadas de *L. tridentata*, se extrajo por separado, con cada disolvente en sistema Soxhlet a 39 y 64.7 °C, respectivamente, durante 15 h de reflujo, seguida de una evaporación rotatoria. Para el extracto EtOH y acuoso, se maceró 1 kg de material fresco en 10 L de solución etanol:agua 7:3 (v/v) durante 8 días a temperatura ambiente (25 °C) y en la obscuridad. Transcurrido este tiempo, se filtró con gasa y posteriormente en papel (Whatman #5). El filtrado se sometió a evaporación rotatoria, la fase sólida se consideró como extracto EtOH y el sobrenadante se congeló a -45 °C y liofilizó para considerarse como extracto acuoso. Se cuantificó el contenido de ANDG en los cuatro extractos obtenidos, mediante cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC), en un sistema HPLC (Hewlett Packard series 1100, Alemania) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) en el Laboratorio de Ecología Química de CIAD A.C. Hermosillo, Sonora. Se siguió la metodología propuesta por Hyder *et al.* (2002) con el uso de una columna

15 h of reflux, followed by rotatory evaporation. For the EtOH and aqueous extracts, 1 kg of fresh material was softened in 10 L of an ethanol:water solution 7:3 (v/v) for 8 days at room temperature (25 °C) and in the dark. After time it was filtered using gauze and then paper (Whatman #5). The filtrate underwent rotatory evaporation; the solid phase is considered as EtOH extract, and the supernatant was frozen at -45 °C and freeze-dried to be considered as the aqueous extract. The NDGA content was quantified in the four extracts obtained using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), in a HPLC system (Hewlett Packard series 1100, Germany) connected to a diode arrangement detector (DAD) in the Ecological Chemistry Laboratory in CIAD A.C. Hermosillo, Sonora. We used the methodology proposed by Hyder *et al.* (2002) with an ODS C-18 hypersil column and as a mobile phase: A: H₃PO₄ 1 % and B: 85 % acetonitrile-14 % H₂O-1 % H₃PO₄ in a 60/40 proportion, with Isocratic elution, and a flow of 1 mL min⁻¹. The detection was carried out at a wavelength of 283 nm. For the quantification, a calibration curve was created with the NDGA standard (purity ≥ 90 %, Sigma Aldrich, United States). The volume of injection of the NDGA standard and the samples was 25 µL.; the data were analyzed using the software Chemstation (Hewlett Packard, Germany).

Determination of the percentage of inhibition of Forl by *L. tridentata* extracts.

We used the poisoned medium method (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007), which consists in pouring the extracts in the agar dextrose potato (ADP) culture medium in sterile, 5 cm petri dishes; after the medium has solidified, a sample of the vigorous growth margin of the 12-day old strain was planted by poking the center. The period of incubation lasted 7 days at 28 °C.

hypersil ODS C-18 y como fase móvil: A: H₃PO₄ 1 % y B: 85 % acetonitrilo-14 % H₂O-1 % H₃PO₄ en proporción 60/40, con elución isocrática, flujo de 1 mL min⁻¹. La detección se realizó a una longitud de onda de 283 nm. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con el estándar de ANDG (pureza ≥ 90 %, Sigma Aldrich, Estados Unidos). El volumen de inyección del estándar de ANDG y las muestras fue de 25 µL., los datos se analizaron en el software Chemstation (Hewlett Packard, Alemania).

Determinación del porcentaje de inhibición de Forl por efecto de la aplicación de extractos de *L. tridentata*

Se utilizó el método de medio envenenado (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007) que consiste en vertir los extractos al medio de cultivo papa dextrosa agar (ADP) en cajas petri estériles de 5 cm; posterior a la solidificación del medio, se sembró por picadura central una muestra del margen de crecimiento vigoroso de la cepa aislada de 12 días de edad. El periodo de incubación fue de 7 días a 28 °C.

Variables evaluadas. Se registró diariamente el crecimiento micelial a partir del tercer día de incubación, midiendo en mm en dos diámetros cruzados, el monitoreo se detuvo al alcanzar el testigo el 100 % de la caja. La inhibición se determinó con la fórmula del *porcentaje de inhibición*=(dc-dt/dt) x100, donde dc es el diámetro promedio del crecimiento micelial del control y dt es el diámetro del crecimiento micelial con los diferentes extractos (Lira-Saldivar *et al.* 2003).

Diseño experimental. Se empleó un análisis factorial 4x5, donde el factor A fueron los extractos y B las concentraciones (Cuadro 1). El diseño experimental fue completamente al azar y se empleó un ANOVA y comparación de medias por Tukey (p≤0.05) en el software Statgraphics 5.1.

Variables evaluated

The mycelial growth was recorded every day starting on day 3 of incubation, measuring in mm the two crossed diameters; monitoring ceased when the control reached 100% of the Petri dish. The inhibition was determined using the formula of the *percentage of inhibition*=(dc-dt/dt)x100, where dc is the average diameter of the mycelial growth of the control, and dt is the diameter of the mycelial growth with the different extracts (Lira-Saldivar *et al.* 2003).

Experimental design

A 4x5 factorial analysis was used, where A were the extracts, and B, the concentrations (Table1). The experimental design was completely random, and an ANOVA was used, along with a Tukey average comparison test (p≤0.05) in the software Statgraphics 5.1.

Biotest *in vivo*.

This was carried out under greenhouse conditions in the Experimental Transfer and

Cuadro 1. Diseño experimental de los bioensayos in vitro de los extractos de *L. tridentata*.

Table 1. Experimental design of the in vitro iotests of the *L. tridentata* extracts.

Tratamientos	Concentraciones (ppm)			
	DCM ^v	MeOH ^w	EtOH ^x	H ₂ O ^y
1 ^z	0	0	0	0
2	500	500	500	500
3	750	750	750	750
4	1000	1000	1000	1000
5	2000	2000	2000	2000

^vdiclorometano, ^wmetanol, ^xetanol, ^yagua, ^zcontrol negativo: ADP mezclado con acetona:agua / ^vdichloromethane ^wmethanol, ^xethanol, ^ywater, negative control: ADP mixed with acetone:water

Bioensayo *in vivo*

Se realizó en condiciones de invernadero en el Centro Experimental y Transferencia de Tecnología 910 (CETT-910) del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) en el Valle del Yaqui, Sonora. Se emplearon 100 plántulas comerciales de tomate tipo cocktail var. F1 Prolyco2 con 35 días de crecimiento. El manejo agronómico del cultivo (fertilización, riegos y manejo cultural) se realizó de acuerdo a la Agenda Técnica Agrícola de Sonora (SAGARPA, 2015).

Inoculación de Forl. Se sembró por estría la cepa aislada de Forl, en botellas Roux con 250 ml de ADP adicionado con 3.5 ml de ácido tartárico al 10 %, previamente esterilizadas y gelificadas según la NOM-111-SSA1-1994 y Camacho *et al.* (2009). Se incubaron a 28 °C por 7 días hasta obtener desarrollo del micelio. Se colocaron sobre el agar, perlas de vidrio y tween 20 al 0.02 %, mediante movimientos suaves se recuperaron los conidios en un matraz estéril. Se realizó un conteo en la cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de 10^7 conidios mL⁻¹ con agua destilada. En esta solución inoculante se sumergieron por 30 min las raíces de las plántulas, previamente heridas con bisturí en las raíces secundarias, posteriormente, se trasplantaron en macetas de 9 L que contenían suelo tipo franco arcilloso del Valle del Yaqui, Sonora.

Aplicación de tratamientos. Para lograr la adhesión de las diferentes concentraciones de los extractos evaluados, se utilizó el adherente agrícola Gardytec® (Técnica Mineral S.A. de C.V) a razón de 1 L ha⁻¹. Se reactivaron los extractos en acetona a razón de 100 ml ml⁻¹ (extracto DCM y EtOH) y acetona:agua (extracto MeOH y H₂O), se agregó el adherente agrícola y se mezcló hasta obtener una suspensión. Cada 7 días después del trasplante, descubriendo la parte superior de la raíz se aplicó el extracto correspondiente alrededor de esta.

Technology Center 910 of the Sonora Institute of Technology (ITSON) in the Yaqui Valley, Sonora. One hundred commercial cocktail tomato seedlings var. F1 Prolyco2 with 35 days of growth were used. The agronomic management of the crop (fertilization, irrigation, and cultural handling) was carried out according to the Sonora Technical Agricultural Agenda (SAGARPA, 2015).

Inoculation of Forl. The streak plate method was previously used to culture the Forl strain in Roux bottles with 250 ml of ADP with 3.5 ml of tartaric acid at 10 %, previously sterilized and gellified according to NOM-111-SSA1-1994 and Camacho *et al.* (2009). They were incubated at 28 °C for 7 days until the mycelium developed. Glass and 20 al 0.02 % tween beads were placed on the agar; using soft movements, the conidia were moved to a sterilized beaker. They were counted in a Neubauer chamber, and adjusted to a concentration of 10^7 conidia mL⁻¹ with distilled water. The roots of the plantlets were submerged for 30 min in this inoculant solution after having cut an incision into their secondary roots with a scalpel. They were then transplanted into 9 L pots containing clay loam soil from the Yaqui Valley, Sonora.

Application of treatments. To achieve the adhesion of the different concentrations of the extracts evaluated, the agricultural adherent® (Técnica Mineral S.A. de C.V) was used, at 1 L ha⁻¹. The extracts were reactivated in acetone at 100 ml ml⁻¹ (extract DCM and EtOH) and acetone:water (extract MeOH and H₂O), the agricultural adherent was added and mixed until a suspension was obtained. Every 7 days after transplanting, uncovering the top section of the root, the pertinent extract was applied to it.

Variables evaluated

The following measurements were taken, 49 days after inoculation (dai): chlorophyll index with

VARIABLES EVALUADAS

Se efectuaron las siguientes mediciones a los 49 días después de la inoculación (ddi): índice de clorofila con SPAD 502 de Minolta (entre las 11:00 y 14:00 h) en unidades clorofila (UC), altura de la planta con un flexómetro (desde la base del tallo hasta el ápice) y el número de hojas. Posterior a la aparición de la 5ª hoja verdadera se evaluó cada planta en una escala del 1 al 5 (Cuadro 2) según la intensidad de la enfermedad (Marlatt *et al.* 1996). Una vez clasificadas, se calculó el índice de severidad con la fórmula de Townsend y Heuberguer (1943): $Severidad = (\sum nv / 5N) \times 100$, donde n= plantas por cada categoría; v= valor de cada categoría; N= plantas en unidad experimental. Los datos se normalizaron con logaritmo natural antes del ANOVA. La incidencia se calculó por el porcentaje de plantas que presentaron algún síntoma de infección de Forl. Se consideran sobrevivientes las plantas que al término del experimento permanecieron vivas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un arreglo completamente al azar con 10 tratamientos y 10 repeticiones (Cuadro 3). Las concentraciones de los tratamientos se definieron de acuerdo a los resultados de la CMI previamente realizado. Se realizó un ANOVA y prueba de rangos múltiples con el software Statgraphics plus versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del porcentaje de inhibición de Forl por efecto de la aplicación de extractos de *L. Tridentata*

En el Cuadro 4 se muestra la actividad de los extractos evaluados sobre el crecimiento micelial

Cuadro 2. Escala para la evaluación de severidad de Forl en el cultivo de tomate.

Table 2. Scale to evaluate the severity of Forl in the tomato crop.

Clase	Intensidad de la enfermedad
1	No presenta síntomas
2	Clorosis leve, marchitamiento de la planta
3	Clorosis moderada y disminución del crecimiento de la planta
4	Clorosis severa, marchitez y disminución del crecimiento de la planta
5	Muerte de la planta

Marlatt *et al.* (1996)

Minolta SPAD 502 (between 11:00 and 14:00 h) in chlorophyll units (CU), plant height with measuring tape (from the base of the stem to the apex) and number of leaves. After the emergence of the 5th true leaf, each plant was evaluated on a scale of 1 to 5 (Table 2), depending on the intensity of the disease (Marlatt *et al.* 1996). Once classified, the severity index was calculated using the formula by Townsend and Heuberguer (1943): $Severity = (\sum nv / 5N) \times 100$, where n= plants per each category; v= value of each category; N= plants in experimental units. The data were normalized with a natural logarithm before. The incidence was calculated by the percentage of plants that showed some symptom of Forl infection. Plants were considered survivors if they remained alive after the completion of the experiment.

EXPERIMENTAL DESIGN

A totally random design was applied with 10 treatments and 10 repetitions (Table 3). The concentrations of the treatments were defined according to the results of the CMI performed previously. An ANOVA was carried out, as well as a multiple range test using the software Statgraphics plus version 5.1.

Cuadro 3. Tratamientos aplicados en el bioensayo *in vivo*.
Table 3. Treatments applied in the *in vivo* biotest.

Tratamiento	Concentración	Tratamiento	Concentración
1	Testigo sin aplicación	6	EtOH 3000 ppm
2	^u Tecto 60 2 L/Ha	7	^x MeOH 3000 ppm
3	^v DCM 2000 ppm	8	MeOH 6000 ppm
4	DCM 3000 ppm	9	^y H ₂ O 3000 ppm
5	^w EtOH 2000 ppm	10	H ₂ O 6000 ppm

^ufungicida comercial, ^vdiclorometano, ^wetanol, ^xmetanol, ^yagua / ^ucommercial fungicide, ^vdichloromethane, ^wethanol, ^xmethanol, ^ywater.

de Forl. El extracto de *L. tridentata* con DCM presentó inhibición de 98 % a 750 ppm, 94 % el MeOH a 2000 ppm y 97 % el EtOH a 500 ppm, lo que significa que los compuestos extraídos con EtOH tuvieron mayor poder fungicida sobre Forl *in vitro*. Estos resultados sirvieron de base para determinar las dosis para los tratamientos *in vivo*, considerando la concentración de cada extracto ($p \leq 0.05$) que inhibió completamente el crecimiento micelial del hongo. Se decidió aumentar la concentración a 3000 y 6000 ppm del extracto H₂O, por presentar poco efecto sobre la inhibición del crecimiento de Forl.

La máxima inhibición del extracto hidroalcohólico de *L. tridentata* se ha reportado en 7000 y 5000 ppm para *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp., respectivamente (Moreno-Limón *et al.*, 2011). El efecto antifúngico de *L. tridentata* se atribuye a los compuestos fenólicos, debido a que extractos polifenólicos inhibieron al máximo con 0.7 ppm en *Pythium* sp., *Colletotrichum truncatum*, *C. cocco-des*, *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. sambucinum* y *Rhizoctonia solani* (Osorio *et al.*, 2010).

Entre los compuestos fenólicos de *L. tridentata* destaca el ANDG, compuesto que se extrae de la resina en hojas y tallos (Lira *et al.*, 2003). La cantidad que se extrajo de éste compuesto está directamente relacionado al grado de polaridad del

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of the percentage of Forl inhibition by the effect of applying *L. Tridentata* extracts.

Table 4 shows the activity of the extracts on the mycelial growth of Forl. The *L. tridentata* extract with DCM displayed an inhibition of 98 % at 750 ppm; 94 % for MeOH at 2000 ppm, and 97 % for EtOH at 500 ppm, which indicates that the compounds extracted with EtOH had a greater fungicidal power over Forl *in vitro*. These results

Cuadro 4. Efecto de los extractos de *L. tridentata* sobre el crecimiento micelial de Forl.

Table 4. Effect of the *L. tridentata* extracts on the mycelial growth of Forl.

Concentración (ppm)	Extractos (% inhibición)			
	^v DCM	^w MeOH	^x EtOH	^y H ₂ O
0	0 c	0 c	0 b	0 c
500	89 b	84 b	97 a	25 b
750	98 a	85 ab	100 a	25 b
1000	100 a	85 ab	100 a	29 ab
2000	100 a	94 a	100 a	41 a

^vdiclorometano, ^wmetanol, ^xetanol, ^yagua / ^vdichloromethane, ^wmethanol, ^xethanol, ^ywater.

Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) / Different letters represent significant differences between treatments (Tukey $p \leq 0.05$).

disolvente (Moreno-Limón *et al.*, 2011). De éste modo, en el presente ensayo se cuantificaron 68, 64, 6.07 y 2.8 mg g⁻¹ de ANDG en los extractos de DCM, EtOH, MeOH y H₂O, respectivamente, correlacionando las concentraciones cuantificadas en los extractos con el efecto sobre el crecimiento micelial que se presenta en el Cuadro 4.

Es sumamente complejo estandarizar una recomendación para el uso de extractos en el control de microorganismos fitopatógenos, ya que además del triángulo básico hospedero-patógeno-clima, influyen gran cantidad de factores como: disolvente y condiciones de extracción, latitud y altitud de la zona de muestreo de *L. tridentata* (Lira-Saldivar *et al.*, 2003), variabilidad en razas y patogenicidad entre las formas especiales de *F. oxysporum* Fol y Forl; más aún, *in vivo* debe considerarse el efecto de la biodiversidad de organismos en el suelo y ambiente.

Bioensayo *in vivo*

Índice de clorofila. El contenido de clorofila en las hojas se muestra en el Cuadro 5. Todos los extractos presentaron niveles superiores ($p < 0.05$) en comparación con el testigo absoluto y el fungicida comercial. Destacan los tratamientos con H₂O 6000, DCM 3000 y MeOH 4000 ppm con 49, 48 y 45 unidades de clorofila, respectivamente, los cuales son valores superiores a los reportados para plantas de tomate sanas (35 y 37 UC) (Mercado-Luna *et al.*, 2010). Los demás tratamientos presentaron valores dentro de este rango, a excepción del testigo y el control positivo donde se observó el daño causado por Forl.

Las UC proveen una medida indirecta y cuantitativa de la cantidad de N en la planta, además del efecto de variables climáticas (Rincón-Castillo y Ligarreto, 2010; Vázquez *et al.*, 2012). Las plantas tratadas con extractos de *L. tridentata* mantuvieron un estado general de bienestar, aun cuando fueron infectadas con Forl.

were used as a basis to determine the doses for the treatments *in vivo*, considering the concentration of each extract ($p \leq 0.05$) the completely inhibited the mycelial growth of the fungus. The concentration was increased to 3000 y 6000ppm of the extract H₂O, since it presented little effect on the growth inhibition of Forl.

The highest inhibition of the hydroalcoholic extract of *L. tridentata* has been reported at 7000 ppm for *Aspergillus flavus* and 5000 ppm for *Penicillium sp.* (Moreno-Limón *et al.*, 2011). The antifungal effect of *L. tridentata* is attributed to phenolic compounds, because polyphenolic extracts inhibited to the maximum with 0.7 ppm in *Pythium sp.*, *Colletotrichum truncatum*, *C. coccodes*, *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. Sambucinum* and *Rhizoctonia solani* (Osorio *et al.*, 2010).

Among the phenolic compounds of *L. tridentata*, NDGA stands out since it is extracted from the resin in leaves and stems (Lira *et al.*, 2003). The amount of this compound extracted is directly related to the degree of polarity of the solvent (Moreno-Limón *et al.*, 2011). In this way, this study quantified 68, 64, 6.07, and 2.8 mg g⁻¹ of NDGA in the extracts of DCM, EtOH, MeOH, and H₂O, respectively, correlating the concentrations quantified in the extracts with the effect on the mycelial growth shown in Table 4.

Giving a standard recommendation for the use of extracts in the control of phytopathogenic microorganisms, since there is not only the influence of the basic triangle host-pathogen-weather, but also of factors such as solvents and conditions of extraction, latitude and altitude of the area of sampling of *L. tridentata* (Lira-Saldivar *et al.*, 2003), variability in breeds and pathogenicity among the special forms of *F. oxysporum* Fol and Forl; furthermore, *in vivo* one must consider the effect of the biodiversity of organisms in the soil and the surroundings.

Cuadro 5. Desarrollo vegetativo de plantas de tomate inoculadas con Forl y tratadas con extractos de *L. tridentata* a los 49 ddi.
Table 5. Vegetative development of tomato plants inoculated with Forl and treated with *L. tridentata* extracts at 49 dai.

Tratamientos	Concentraciones	Clorofila (UC)	Altura de planta (cm)	Número de hojas
1	Testigo sin aplicación	29.5 a	18.0 a	2.0 a
2	^u Tecto 60 2 L/Ha	35.5 abc	68.5 b	11.2 b
3	^v DCM 2000 ppm	40.5 abc	78.6 bcd	14.0 bc
4	DCM 3000 ppm	43.7 c	97.0 cd	16.8 c
5	^w EtOH 2000 ppm	36.9 bc	75.0 bc	13.2 bc
6	EtOH 3000 ppm	35.4 abc	90.9 bcd	13.5 bc
7	^x MeOH 3000 ppm	43.0 c	101.5 d	17.0 c
8	MeOH 6000 ppm	41.0 bc	80.8 bcd	13.8 bc
9	^y H ₂ O 3000 ppm	40.9 abc	101.8 cd	16.3 bc
10	H ₂ O 6000 ppm	44.0 ab	90.0 bcd	15.0 bc

^ufungicida comercial, ^vdiclorometano, ^wetanol, ^xmetanol, ^yagua. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$) / ^ucommercial fungicide, ^vdichloromethane, ^wethanol, ^xmethanol, ^ywater. Different letters represent significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Altura de planta. En el Cuadro 5, se observan los valores de la altura de las plantas en cada tratamiento, todos los extractos fueron estadísticamente superiores ($p \leq 0.05$) al testigo absoluto y fungicida comercial, desde la primera semana hasta el término del experimento. Los tratamientos H₂O 4000, MeOH 4000 y DCM 3000 ppm, presentaron plantas con 49, 48, 42 % mayor altura, respecto a las plantas que recibieron el fungicida comercial. Se reportaron incrementos en altura de plantas de tomate (144 y 148 %) por Díaz-Díaz *et al.* (2013) con extractos de *L. tridentata* en concentraciones de 3000 y 2000 ppm con el uso de MeOH y acetona como disolventes. En el testigo absoluto (0 ppm) se observó retraso en el crecimiento general, a consecuencia de la sintomatología característica de Forl: invasión de raíz, pérdida prematura de hojas inferiores y pudrición de la radícula. Los extractos de Neem (*Azardiachta indica*) al igual que *L. tridentata* favorecen la altura (hasta en un 35 % comparado con el testigo) de plantas de tomate cuando han sido infectadas con *F. oxysporum* (Hadian *et al.*, 2011).

Biotest *in vivo*

Chlorophyll index. The content of chlorophyll in the leaves is shown in Table 5. All the extracts displayed higher levels ($p < 0.05$) in comparison with the absolute control and the commercial fungicide. The treatments worth pointing out are those with H₂O 6000, DCM 3000, and MeOH 4000 ppm with 49, 48, and 45 units of chlorophyll, respectively, which are values higher than those reported for healthy tomato plants (35 and 37 UC) (Mercado-Luna *et al.*, 2010). The remaining treatments presented values within this range, except for the control and the positive control, which showed the damage caused by Forl.

The UCs provide an indirect and quantitative measure of the amount of N in the plant, as well as the effect of weather variables (Rincón-Castillo and Ligarreto, 2010; Vázquez *et al.*, 2012). The plants treated with *L. tridentata* extracts maintained an overall state of well-being, even after having been infected with Forl.

Número de hojas. Todos los tratamientos presentaron mayor número de hojas ($p \leq 0.05$) que el testigo absoluto, sobresaliendo los tratamientos MeOH 4000, DCM 3000, H₂O 4000 ppm, con 52, 50 y 45 % más hojas que el fungicida comercial, respectivamente (Cuadro 5). Díaz-Díaz *et al.* (2013) registraron un incremento de 25 % en el peso seco al aplicar extractos de *L. tridentata* a 3000 y 2000 ppm en plantas de tomate inoculadas con *P. capsici* lo que da cuenta de una mayor desarrollo vegetativo al igual que los resultados aquí presentados; se reporta también el uso de infusión de *L. tridentata* como estimulante del desarrollo vegetal en tomate, en combinación con lanolina y manteca de cacao, al aumentar el peso seco (77 %) y fresco (100 %) (Recinos, 2010). No se observaron signos de toxicidad en las dosis utilizadas, al igual que los extractos acuosos de *L. tridentata* al 30 % y después de 5 días de aplicación (Rojob, 2008). La infestación de Forl, implica marchitez de las hojas inferiores hacia la parte superior (Fernández-Herrera *et al.*, 2013) por lo que los bajos niveles de infestación permitió a las plantas generar y conservaron mayor número de hojas que el testigo absoluto y fungicida comercial.

Severidad. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos MeOH a 4000 y DCM a 3000 ppm, los cuales presentaron índices de severidad de 55 y 57 % (respectivamente) en comparación con el 94 % del testigo absoluto y H₂O 6000 ppm. Díaz-Díaz *et al.* (2013) reportaron hasta 83 % de disminución en la severidad al evaluar plantas de tomate infectadas con *P. capsici* y tratadas con extractos de *L. tridentata* y acetona a concentraciones de 2000 ppm. Los resultados mostrados (Figura 1-A) señalan un 45 % de disminución de la severidad en MeOH 4000ppm y se establece la relación entre las variables del desarrollo vegetativo y la PCT. Existe un comportamiento

Plant height. Table 5 shows the values for plant height in each treatment; all the extracts were statistically higher ($p \leq 0.05$) to the absolute control and commercial fungicide, from the first week to the end of the experiment. Treatments H₂O 4000, MeOH 4000, and DCM 3000 ppm, presented plants 49, 48, 42 % taller than plants that received the commercial fungicide. Increases in plant height were reported for tomato plants (144 and 148 %) by Díaz-Díaz *et al.* (2013) with *L. tridentata* extracts in concentrations of 3000 and 2000 ppm with the use of MeOH and acetone as solvents. The absolute control (0 ppm) showed general growth delay caused by the typical symptomatology of Forl: invasion of the root, premature loss of lower leaves and rot of the radicle. The Neem (*Azardiachta indica*) and *L. tridentata* extracts favor height (up to 35 % in comparison to the control) in tomato plants when they have been infected with *F. oxysporum* (Hadian *et al.*, 2011).

Leaf number. All the treatments presented a higher number of leaves ($p \leq 0.05$) than the absolute control, particularly the treatments MeOH 4000, DCM 3000, H₂O 4000 ppm, with 52, 50, and 45 % more leaves than the commercial fungicide, respectively (Table 5). Díaz-Díaz *et al.* (2013) recorded a 25 % increase in dry weight when applying extracts of *L. tridentata* by 3000 and 2000 ppm in tomato plants inoculated with *P. capsici*, which accounts for a greater vegetative growth, as in the results presented in this investigation; the use of *L. tridentata* as an infusion is also reported as a stimulant tomato plant growth in combination with lanoline and cocoa butter, since it increases dry (77 %) and fresh weights (100 %) (Recinos, 2010). No signs of toxicity were observed in the doses used, as was the case in the aqueous extracts of *L. tridentata* at 30 % and after 5 days of application (Rojob, 2008). The infestation by Forl implies the wilting of the lower

similar entre los tratamientos DCM 3000, MeOH 4000 y H₂O 4000 ppm, con los cuales se obtuvieron menores índices de severidad y valores superiores de clorofila, altura y número de hojas respecto al fungicida comercial, considerándose el primer reporte sobre la severidad que presenta Forl sobre plantas de tomate que han sido tratadas con extractos de *L. tridentata*.

El extracto DCM 3000 ppm, presentó el mínimo índice de severidad y un desarrollo vegetativo superior respecto al fungicida comercial, así como una inhibición del 100% a 1000 ppm en el bioensayo *in vitro* de Forl y mayor contenido de ANDG. En relación con lo anterior, Martins *et al.* (2012) plantearon que la actividad antifúngica de *L. tridentata* se atribuye a tres compuestos: ANDG, kaempferol y quercetina, los cuales son sumamente compatibles con el disolvente diclorometano encontrándose en mayor disponibilidad por la polaridad que estos poseen. Hanaa *et al.* (2011) y Villa-Martínez (2015) emplearon extractos acuosos de neem y sauce (*Salix babylonica*) en plántulas de tomate, los cuales redujeron la incidencia de la enfermedad de la marchitez por *F. oxysporum* en plántulas de tomate hasta casi un 30%, mediante el aumento de las actividades de las enzimas defensivas antioxidantes secretadas por la planta de tomate, como la peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa.

Incidencia. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$); el 100 % de las plantas tratadas con los tratamientos testigo y H₂O 6000 ppm registraron síntomas de infección de Forl (Figura 1-B); sin embargo, al aplicar los extractos DCM 3000 y MeOH 4000 ppm la incidencia alcanzó apenas 40 y 50 %, respectivamente. No encontramos reportes de ensayos *in vivo* para control de Forl con extractos de *L. Tridentata*; sin embargo, en plantas de zanahoria se reportó 5 % de incidencia de tizón de la hoja causado por *A. dauci* al aplicar

leaves towards the top (Fernández-Herrera *et al.*, 2013), and therefore the lower levels of infestation helped the plants generate and preserve a higher number of leaves than the absolute control and the commercial fungicide.

Severity. Significant differences ($p \leq 0.05$) were found between the treatments with MeOH at 4000 and DCM at 3000 ppm, which displayed severity indices of 55 and 57 % (respectively) in comparison with the 94% of the absolute control and H₂O 6000 ppm. Díaz-Díaz *et al.* (2013) reported reductions of up to 83 % in severity when evaluating tomato plants infected with *P. capsici* and treated with *L. tridentata* extracts and acetone at concentrations of 2000 ppm. The results shown (Figure 1-A) indicate a reduction of 45% in the severity in MeOH 4000ppm, and a relation is established between the variables of vegetative growth and. There is a similar behavior between treatments DCM 3000, MeOH 4000, and H₂O 4000 ppm, which gave lower severity indices and higher levels of chlorophyll, height, and number of leaves than the commercial fungicide, taking into account the first report on the severity of Forl on tomato plants that have been treated with *L. tridentata* extracts.

The extract DCM 3000 ppm presented the lowest severity index and a higher vegetative development than the commercial fungicide, as well as an inhibition of 100% at 1000 ppm in the Forl *in vitro* biotest and a higher NDGA content. In regard to this, Martins *et al.* (2012) stated that the antifungal activity of *L. tridentata* can be attributed to three compounds: NDGA, kaempferol, and quercetin, which are highly compatible with the solvent dichloromethane, which is more available due to the polarity of the three compounds. Hanaa *et al.* (2011) and Villa-Martínez (2015) used aqueous extracts of neem and willow (*Salix*

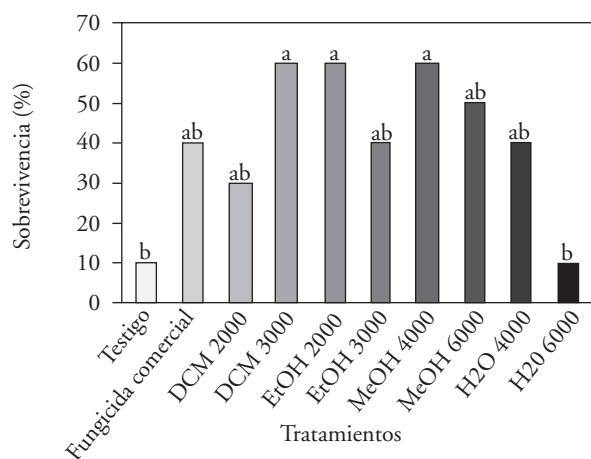
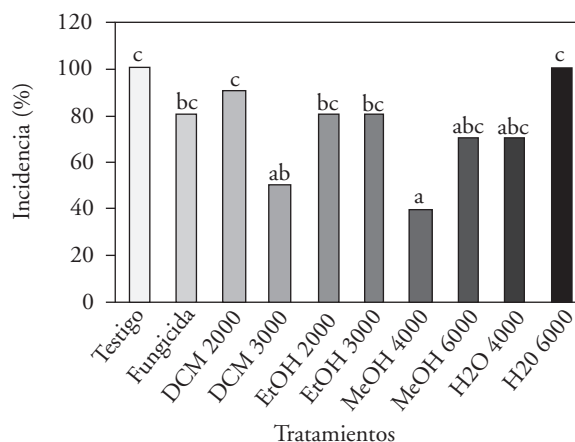
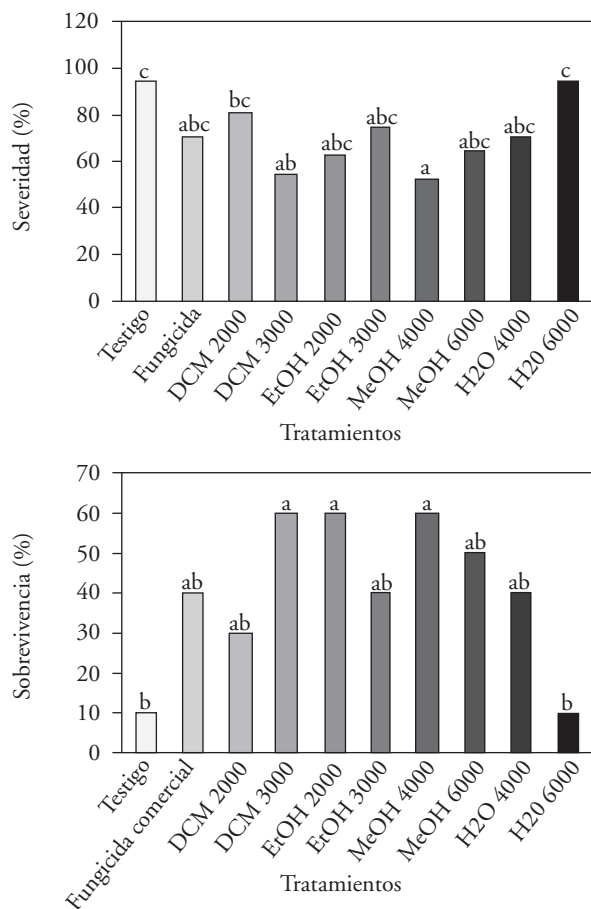


Figura 1. Porcentaje de severidad (A), incidencia (B) y sobrevivencia (C) de plantas inoculadas con Forl.
Figure 1. Percentage of severity (A), incidence (B) and survival (C) of plants inoculated with Forl.

un extracto hidrosoluble de *L. tridentata*, mezclado con quitosano (Hernández-Castillo *et al.* 2006).

Sobrevivencia. A los 49 ddi sobrevivió una de cada diez plantas tratadas con el testigo y H₂O a 6000 ppm mientras que con los extractos DCM 3000 y MeOH 4000 ppm favorecieron la sobrevivencia del 60 % de las plantas. Con los tratamientos EtOH 2000 y MeOH 6000 ppm 50 % y con el fungicida comercial 40 % (Figura 1-C). Estos resultados demuestran una disminución de la agresividad de Forl por efecto de los extractos vegetales de *L. tridentata*, lo cual puede atribuirse a que las sustancias fenólicas presentes en los extractos reaccionan químicamente con los sistemas sensitivos

babylonica) in tomato plantlets, which reduced the incidence of the disease of wilting by *F. oxysporum* in tomato plantlets by up to 30%, by the increase of the defensive antioxidant enzymes secreted by the tomato plants, such as peroxidase, catalase and the dismutase superoxidase.

Incidence. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were obtained; 100 % of the plants treated with the control and H₂O 6000 ppm treatments registered symptoms of Forl infection (Figure 1-B); however, when applying the extracts DCM 3000 and MeOH 4000 ppm, the incidence reached only 40 and 50 %, respectively. No reports were found on *in vivo* tests for the control of Forl with *L.*

de las enzimas volviéndolas catalíticamente inactivas ante este patógeno, favoreciendo por lo tanto la sobrevivencia de las plantas (Tappel y Marr, 1954).

CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron permiten concluir que los extractos de *L. tridentata* pueden ser utilizados como parte de un manejo integrado de la pudrición de la corona del tomate causada por *F. oxysporum radices-lycopersici* en condiciones *in vivo*. Destaca la consistencia de los extractos de DCM a 3000 ppm y MeOH a 4000 ppm en la incidencia y severidad de Forl y la sobrevivencia en plantas de tomate. Es importante hacer mención que es el primer reporte *in vivo* donde se evalúe la capacidad antifúngica de los extractos de *L. tridentata* sobre Forl en plantas de tomate en el Valle del Yaqui, aunque es recomendable llevar la investigación a nivel de invernadero comercial enfocándose en disolventes más amigables con el medioambiente.

LITERATURA CITADA

- Apodaca M, Zavaleta E, García R, Osada S y Valenzuela J. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* en Sinaloa México y su control. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1):1-7. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220101>
- Apodaca M, Zavaleta E, Osada S, García R y Valenzuela J. 2004. Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radices lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22(1):7-13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222102>
- Arteaga, S, Andrade-Cetto A and Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. Journal of Ethnopharmacology 98(3):231-239. DOI:10.1016/j.jep.2005.02.002
- Atlas Agroalimentario SIAP. 2016. Atlas Agroalimentario del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México, D.F. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016
- Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B y Velázquez O. 2009. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. Segunda Edición. Facultad de Química,

Tridentata extracts; however, in carrot plants, there were reports of a 5 % incidence of blight caused by *A. dauci* when applying a hydrosoluble extract of *L. tridentata* mixed with chitosan (Hernández-Castillo *et al.* 2006).

Survival. At 49 dai, one out of every 10 plants treated with the control and H₂O at 6000 ppm survived, whereas with extracts DCM 3000 and MeOH 4000 ppm favored the survival of 60 % of the plants. With treatments EtOH 2000 and MeOH 6000 ppm, 50 % and the commercial fungicide, 40 % (Figura 1-C). These reports show a reduction in the aggressiveness of Forl due to the effect of the *L. tridentata* plant extracts, which may be due to the phenolic substances present in the extracts react chemically with the sensitive systems of the enzymes, making them catalytically inactive with this pathogen, therefore favoring the survival of the plants (Tappel and Marr, 1954).

CONCLUSIONS

The results obtained lead to conclude that the *L. tridentata* extracts can be used as a part of an integrated management of the rotting of the tomato crown caused by *F. oxysporum radices-lycopersici* under *in vivo* conditions. The consistency of the extracts of DCM at 3000 ppm and MeOH at 4000 ppm on the incidence and severity of Forl and the survival in tomato plants, stand out. It is important to mention that this is the first report *in vivo* which evaluates the antifungal capability of *L. tridentata* extracts on Forl in tomato plants in the Yaqui Valley, although it is recommendable to take the investigation to a commercial greenhouse level with more environmentally friendly solvents.

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

- UNAM. México. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones\\_6526.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf)
- Cordero-Ramírez JD, López-Rivera R, Figueroa Lopez AM, Mancera-López ME, Martínez-Álvarez JC, Apodaca-Sánchez MA and Maldonado Mendoza IE. 2013. Native soil bacteria isolates in Mexico exhibit a promising antagonist effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Journal of Basic Microbiology 53:838-847. DOI: 10.1002/jobm.201200128
- Díaz-Díaz A, Hernández-Castillo FD, Belmares-Cerda RE, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R y Aguilar-González CN. 2013. Efecto de extractos de *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua* en el desarrollo de plantas de tomate inoculadas con *Phytophthora capsici*. Agraria 10(2):49-58. [http://www.redinnovagro.in/docs/Revista\\_Agraria\\_vol\(10\)\\_No\(2\).pdf](http://www.redinnovagro.in/docs/Revista_Agraria_vol(10)_No(2).pdf)
- Domínguez AG. 2012. Aislamiento, identificación y distribución de *Fusarium* spp. en jitomate cultivado en suelo bajo invernadero. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI). Yautepec, Morelos, México. <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/12423/Grisel%20Dom%20C3%ADnguez%20Arizmendi%20Noviembre%202012.pdf?sequence=1>
- Fernández-Herrera E, Guerrero J, Rueda E y Acosta M. 2013. Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. Revista Ciencias biológicas y de la salud. Universidad de Sonora 15(3):46-50. <http://www.biocetnia.uson.mx/revistas/articulos/24-Articulo%207.pdf>
- González HA. 2014. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. Segunda Edición. Elsevier. España. 488p.
- González S y Carrasco J. 2002. Pasos para eliminar el bromuro de metilo en Chile, Tierra adentro, Mayo- Junio, 46-49. [http://www2.inia.cl/medios/tierraadentro/pdf/N68-p46\\_49.pdf](http://www2.inia.cl/medios/tierraadentro/pdf/N68-p46_49.pdf)
- Guerrero-Rodríguez E, Solís-Gaona S, Hernández-Castillo F, Flores-Olivas A, Sandoval-López V y Jasso-Cantú D. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha; *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25(1):48-53. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225107.pdf>
- Hadian S, Rahnema K, Jamali S and Eskandari A. 2011. Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology 5(8):2052-2057. <http://www.aensiweb.com/old/aeb/2011/2052-2057.pdf>
- Hanna F, Abdou Z, Salama D, Ibrahim M and Srour H. 2011. Effect of neem and willow aqueous extract fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. Annals of agricultural Science 56: 1-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.aoas.2011.05.007>
- Hernández-Castillo F, Aguirre-Aguirre A, Lira-Saldivar R, Guerrero E y Gallegos-Morales G. 2006. Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria. PHYTON-International Journal of Experimental Botany 75:91-101. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-56572006000100009](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572006000100009)
- Hirano Y and Arie T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of General Plant Pathology 72:273-283. DOI:10.1007/s10327-006-0287-7
- SAGARPA-SENASICA-INIFAP. 2015. Agenda Técnica Agrícola de Sonora. Segunda Edición. SAGARPA. México, D.F. 383p.
- Lira-Saldivar R. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C.) Coville). Revista Mexicana de Fitopatología 21(2):214-222. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221217.pdf>
- Lira-Saldivar R, Gamboa-Alvarado R, Villareal-Cárdenas L, López-Campos R and Jiménez-Díaz F. 2002. Hydrosoluble extracts of *Larrea tridentata* from two desertic zones in the north of Mexico and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*. PHYTON-International Journal of Experimental Botany 167-172. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=15426010>
- Lira-Saldivar R, Hernández M and Hernández F. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (D.C) Coville L. Extracts and chitosan against fungi that effect horticultural crops. Chapingo Serie Horticultura 12(2):211-216. DOI: [dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2006.05.023](http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2006.05.023)
- Leslie J and Summerell B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. USA. 388 p. DOI: 10.1002/9780470278376
- López A, López S, Vázquez M, Rodríguez S, Mendoza M y Padrón E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen. *Rhizotocnia solani* Kühn and *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. Revista Mexicana de Fitopatología 23(2):183-190. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>
- Lira-Saldivar R, Balvanti G, Hernández R, Gamboa D, Jasso R and Jiménez F. 2003. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex D.C.) Coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. Revista Mexicana de Fitopatología 21(2):97-101. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221201.pdf>
- Marlatt M, Corell J and Kauffman P. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. Plant Disease 80:1336-1342. DOI: 10.1094/PD-80-1336.
- Martins S, Aguilar CN, Teixeira JA and Mussato SI. 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. Separation and Purification Technology 88:163-167. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.020>
- Martins S, Amorim E, Sobrinho T, Saraiva AM, Pisciotano M, Aguilar C, Teixeira JA and Mussato SI. 2013. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. Industrial Crops and Products 41:306-311. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.037>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato disease caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection 73:78-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>

- Méndez M, Rodríguez R, Ruiz J, Morales-Adame D, Castillo F, Hernández-Castillo FD and Aguilar CN. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products* 37:445-450. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.017>
- Mercado-Luna A, Rico-García E, Lara-Herrera A, Soto-Zarazúa G, Ocampo-Velázquez R, Guevara-González R, Herrera-Ruiz G and Torres-Pacheco I. 2010. Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology* 9(33):5326-5332. DOI: 10.5897/AJB10.130
- Moreno-Limón S, González-Solís LN, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Ávila MI y Perales-Ramírez A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205. <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n32/n32a12.pdf>
- Nelson PE, Tousson TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press.
- NOM-111-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. <http://www.economia-noms.gob.mx> (consulta, enero 2017).
- Osorio E, Flores M, Hernández D, Ventura D, Rodríguez R and Aguilar C. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 31:153-157. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669009001861>
- Peñuelas- Rubio O, Arellano-Gil M, Vargas-Arispuro I, Lares-Villa F, Cantú-Soto E, Hernández-Rodríguez SE, Gutiérrez-Coronado MA y Mungarro-Ibarra C. 2015. Bioactividad *in vitro* de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*. *Revista Polibotánica* 40(12):183-198. DOI: 10.18387/polibotanica.40.12
- Quilambaqui H. 2005. Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* spp. asociadas al declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guanajuato, México. *Revista Tecnológica ESPOL* 18(1):135-140. <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/viewFile/238/180>
- Recinos DAL. 2010. Efecto del uso de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) en plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah., México. pp. 28-30. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4422/T17687%20RECINOS%20DIAZ,%20ANA%20LI-LIAN%20%2061068.pdf?sequence=1>
- Rincón-Castillo A y Ligarreto G. 2010. Relación entre nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos en el Piedemonte Llanero colombiano. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11(2): 122-128. <http://www.redalyc.org/pdf/4499/449945029003.pdf>
- Rojob A. 2008. Control *in vitro* con extractos vegetales de patógenos que afectan el cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de licenciatura de la Universidad Autónoma de Querétaro. <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/2802/1/RI002644.pdf>
- Szczeczura W, Staniaszek M and Habdas H. 2013. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*-the cause of Fusarium crown and root rot in tomato cultivation. *Journal of Plant Protection Research* 53(2): 172-176. DOI: 10.2478/jppr-2013-0026
- Tappel A and Marr G. 1954. Effect of alpha-tocopherol, propyl gallate and nordihydroguaiaretic acid on enzymatic reaction. *Agricultural and Food Chemistry* 2(11):554-558. DOI: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf60031a003>
- Townsend GR and Heuberger JW. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 27:340-343.
- Ulacio D, Salas J, Querales P y Sanabria M. 2002. Microbiota del suelo de zonas productoras de papa del estado Mérida y su relación con *Rizhoctonia solani*. *Bioagro (Venezuela)* 14(1):11-16. [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14\(1\)/2.%20Micobiota%20del%20suelo.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14(1)/2.%20Micobiota%20del%20suelo.pdf)
- Vázquez M, Jiménez S, Torres I, Anaya I, Mendoza H y Guevara R. 2012. Comportamiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) asperjadas con ácido salicílico cultivadas bajo diferentes condiciones climáticas en invernadero. *Ciencia@UAQ* 5(1):1-9. [http://www.uaq.mx/investigacion/revista\\_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v5-n1/articulo6.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v5-n1/articulo6.pdf)
- Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales H, Basurto Sotelo M, Soto-Parra J y Martínez-Escudero E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica* 64(2):194- 205. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Vogt V, Cifuentes D, Tonn C, Sabini L and Rosas S. 2013. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. *Industrial Crops and Products* 42:583-586. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.06.009

# Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, Mexico

## DetECCIÓN, IDENTIFICACIÓN E INFERENCIA FILOGENÉTICA DEL NEMATODO DEL TALLO *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) afectando alfalfa *Medicago sativa* L. en Jalisco, México

**Leonel Rosas-Hernández**, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230, México; **Angel Ramírez-Suárez\***, CONACYT-Centro Nacional de Metrología, Km 4.5 Carretera a Los Cués, El Marqués, Querétaro, C.P. 76246, México; **Salomé Alcasio-Rangel, José Abel López-Buenfil**, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA, Km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Tecámac. Estado de México. C.P. 55740. México; **Edgar Medina-Gómez**, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 0496. México. \*Autor para correspondencia: angelrasu75@huskers.unl.edu.

Recibido: 23 de Marzo, 2017.

Aceptado: 13 de Junio, 2017.

Rosas-Hernández L, Ramírez-Suárez A, Alcasio-Rangel S, López-Buenfil JA, Medina-Gómez E. 2017. Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 377-396.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-8

Primera publicación DOI: 24 de Julio, 2017.

First DOI publication: July 24, 2017.

**Resumen.** El monitoreo de plagas y enfermedades reglamentadas que afectan a los cultivos en México es importante para determinar su presencia

**Abstract.** Monitoring regulated pests and diseases that affect crops in Mexico is important to determine its presence and impact. With the purpose of supporting the National Phytosanitary Epidemiological Surveillance System activities, alfalfa plants from Atoyac, Jalisco showing stunting, shortened internodes, buds and leaves deformed as well as change leaf coloration, suspicious symptoms produced by foliar nematodes were analyzed. Roots, leaves + buds and stems tissues were analyzed separately. Classical taxonomy, molecular and phylogenetic analysis of two ribosomal DNA markers were performed on specimens detected. *Ditylenchus* genus specimens were detected and isolated only in leaves + buds and stems. The species identity

e impacto. Con la finalidad de colaborar con las actividades del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, se analizaron plantas de alfalfa de Atoyac, Jalisco con acortamiento de entrenudos, deformación de brotes, hojas y decoloración de foliolos, síntomas sospechosos a infestaciones por nematodos foliares. Se analizaron por separado raíces, hojas + brotes y tallos. Se realizó la taxonomía tradicional, análisis molecular y filogenético de dos marcadores del ADN ribosomal de los nematodos detectados. Se aislaron especímenes del género *Ditylenchus* solo en hojas + brotes y tallos. La identidad de la especie según la morfotaxonomía de hembras y machos correspondió al nematodo del tallo *D. dipsaci*. El análisis PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 mostró un patrón de restricción de 335, 280, 200 y 132 pb con la enzima *RsaI* y de 400 y 300 pb con *HinfI*. La alineación BLAST indicó un 99% de homología con *D. dipsaci* ( $E=0.0$ ). La filogenia según el criterio de probabilidades posteriores bayesiano de ambos marcadores ubicó a la población mexicana de alfalfa en el grupo que incluye las poblaciones de *D. dipsaci sensu stricto*. A nuestro saber, este es el primer reporte de *D. dipsaci* afectando alfalfa en el occidente de México.

**Palabras clave:** Vigilancia fitosanitaria, taxonomía, filogenia, molecular, DNA ribosomal.

La alfalfa *Medicago sativa* L. es una planta forrajera con alto valor nutritivo en el sector bovino. En México, este cultivo es afectado por factores bióticos entre las que destacan el pulgón verde *Acyrtosiphon pisum* Harris, pulgón manchado *Therioaphis maculata* Buckton, trips *Frankliniella* spp., gusano soldado *Spodoptera exigua* Hübner, pudriciones de la base del tallo *Rhizoctonia solani* Kühn, antracnosis *Colletotrichum trifolii* Bain &

based on females and males morphotaxonomy belonged to the stem nematode *D. dipsaci*. The PCR-RFLP restriction pattern of ITS1-5.8S-ITS2 displayed by *RsaI* enzyme was 335, 280, 200, and 132 bp, while for the enzyme *HinfI* the pattern was 400 and 300 bp. The BLASTING alignment showed 99% homology with *D. dipsaci* ( $E=0.0$ ). The phylogenetic reconstruction of both markers according the bayesian posterior probabilities criteria placed the alfalfa mexican population within the clade that includes several *D. dipsaci sensu stricto* populations. To our knowledge, this is the first report of *D. dipsaci* affecting alfalfa in western Mexico.

**Key words:** Phytosanitary surveillance, taxonomy, phylogeny, molecular, ribosomal DNA

Alfalfa *Medicago sativa* L. is a forage plant with a high nutritional value in the bovine sector. In Mexico, this crop is affected by biotic factors, among which highlight the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris, the spotted alfalfa aphid *Therioaphis maculata* Buckton, trips *Frankliniella* spp., the beet armyworm *Spodoptera exigua* Hübner, rotting on the base of the stem *Rhizoctonia solani* Kühn, anthracnosis *Colletotrichum trifolii* Bain & Essary, Texas root rot *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert, crown rot (*Fusarium* spp.), all of which cause production losses (Chew, 2000; Lara and Jurado, 2014). Little is known about the problems caused by nematodes, although in other latitudes they are considered important problems, particularly the root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* (Griffin and Thyr, 1988; Westerdahl, *et al.*, 2006), lesion nematodes *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven (Thies *et al.*, 1992) and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857)

Essary, pudrición texana *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert, pudrición de la corona (*Fusarium* spp.), entre otros, los cuales causan pérdidas de producción (Chew, 2000; Lara y Jurado, 2014). Poco se conoce de los problemas ocasionados por nematodos sin embargo, en otras latitudes son considerados como problemas importantes donde destacan los nematodos agalladores del género *Meloidogyne* (Griffin y Thyr, 1988; Westerdahl, *et al.*, 2006), lesionadores *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven (Thies *et al.*, 1992) y el nematodo del tallo *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev 1936 (Wood y Close, 1974; Boelter *et al.*, 1985; Milano de Tomasel y McIntyre, 2001; Perera *et al.*, 2009).

El nematodo del tallo *D. dipsaci* es considerado como uno de los problemas nematológicos más importantes en la agricultura de climas templados donde destacan los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), ajo (*Allium sativum* L.), cebolla (*A. cepa* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), tulipán (*Tulipa* spp.), trebol (*Trifolium* spp.), remolacha (*Beta vulgaris* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.) (EPPO, 2008; Tenuta *et al.*, 2014). Es una especie con endoparasitismo obligado, polífago de partes aéreas y subterráneas de alrededor de 500 especies de plantas entre las que destacan hortalizas, cereales, leguminosas y ornamentales (Caubel y Pedron, 1976; Subbotin y Riley, 2012). Posee alrededor de 30 razas fisiológicas, muchas de ellas probablemente representando un complejo de especies difíciles de diferenciar debido a su gran similitud morfológica, cariotípica y molecular (Sturhan y Brzesky, 1991; Duncan y Moens, 2006).

El análisis del ADN ribosomal ha logrado dilucidar la situación taxonómica de *D. dipsaci* y se tiene evidencia de que está compuesta por al menos siete especies: 1. *D. dipsaci sensu stricto* (*s. s.*) que es la de mayor importancia por el número de cultivos que afecta; 2. *D. gigas*, conocido como nematodo

Filipjev 1936 (Wood and Close, 1974; Boelter *et al.*, 1985; Milano de Tomasel and McIntyre, 2001; Perera *et al.*, 2009).

The stem nematode *D. dipsaci* is considered one of the most important nematological problems in agriculture on temperate climates, standing out crops such as potato (*Solanum tuberosum* L.), garlic (*Allium sativum* L.), onion (*A. cepa* L.), carrot (*Daucus carota* L.), tulip (*Tulipa* spp.), clover (*Trifolium* spp.), beetroot (*Beta vulgaris* L.), and alfalfa (*Medicago sativa* L.) (EPPO, 2008; Tenuta *et al.*, 2014). It is a species with obligated endoparasitism, polyphagous of aerial and underground parts of around 500 species of plants, including vegetables, cereals, legumes, and ornamental plants (Caubel and Pedron, 1976; Subbotin and Riley, 2012). It has around 30 physiological races, most of which probably represent species complex that are difficult to differentiate due to their huge morphological, karyotypic and molecular similarity (Sturhan and Brzesky, 1991; Duncan and Moens, 2006).

The ribosomal DNA analysis has allowed to elucidate the taxonomic situation of *D. dipsaci* and there is evidence of it being composed by at least seven species: 1. *D. dipsaci sensu stricto* (*s. s.*), which is the most important due to the wide number of crops it affects; 2. *D. gigas*, known as a “giant” nematode, due to its large size, and it affects *Vicia faba*; 3. *D. weischeri*, which affects *Cirsium arvense*; 4. *Ditylenchus* sp. D., which affects *Pilosella* spp.; 5. *Ditylenchus* sp. E., which affects *Crepis praemorsa*; 6. *Ditylenchus* sp. F., which affects *Leontodon autumnalis* and *Pilosella officinarum*; and 7. *Ditylenchus* spp. G., which affects *Plantago maritima* (Subbotin *et al.*, 2005; Kerkoud *et al.*, 2007; Marek *et al.*, 2010; Vovlas *et al.*, 2011; Jeszke *et al.*, 2014).

The physiological race is an intraspecific division that is set apart from other members of



“gigante” debido a su gran tamaño y afecta *Vicia faba*; 3. *D. weischeri*, que afecta *Cirsium arvense*; 4. *Ditylenchus* sp. D. que afecta *Pilosella* spp.; 5. *Ditylenchus* sp. E. afectando *Crepis praemorsa*; 6. *Ditylenchus* sp. F. afectando *Leontodon autumnalis* y *Pilosella officinarum*; y 7. *Ditylenchus* sp. G. afectando *Plantago maritima* (Subbotin *et al.*, 2005; Kerkoud *et al.*, 2007; Marek *et al.*, 2010; Vovlas *et al.*, 2011; Jeszke *et al.*, 2014).

La raza fisiológica es una división infraespecífica que se distingue de otros miembros de la misma especie por la patogenicidad que ocasiona en diferentes hospederos. Las razas de *D. dipsaci* s. s. coadyuvan en la amplia adaptabilidad de la especie a diversos climas y hospederos por lo que es considerado de importancia cuarentenaria por las agencias regulatorias fitosanitarias internacionales (Tenuta *et al.*, 2014).

La alfalfa es un hospedero que también es afectado por *D. dipsaci* donde es conocido como el nematodo de la Alfalfa ya que parasitan los brotes, tallos, hojas y pueden ocasionar defoliación y muerte de plántulas (Milano de Tomasel y McIntyre, 2001; Westerdahl, *et al.*, 2006). Al afectar la semilla botánica y vegetativa, representa un riesgo en la diseminación a zonas donde no se encuentra presente (Wood y Close 1974; Gray *et al.*, 1994; Milano de Tomasel y McIntyre, 2001).

Durante 2014, el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (ProVEF) del SENASICA-SAGARPA en Jalisco, México, realizó un muestreo en el cultivo de alfalfa seleccionando plantas que presentaban crecimiento reducido, acortamiento de entrenudos, deformación y decoloración de brotes y hojas. Estos síntomas son parecidos a los producidos por nematodos foliares en alfalfa (Evans *et al.*, 2008) pero en México no se tenía evidencia de su presencia por lo que se planteó el objetivo de determinar la identidad taxonómica y molecular de los nematodos detectados, así como sus afinidades filogenéticas.

the same species by the pathogenicity it causes in different hosts. Races of *D. dipsaci* s. s. contribute in the wide adaptability of the species to diverse climates and hosts, and is therefore considered of quarantine importance by international plant health regulation agencies (Tenuta *et al.*, 2014).

Alfalfa is a host also affected by *D. dipsaci*, where it is known as the alfalfa nematode, since sprouts, stems and leaves are infected and can cause defoliation and death of plantlets (Milano de Tomasel and McIntyre, 2001; Westerdahl, *et al.*, 2006). By affecting the botanical and vegetative seed, it is a risk for the dissemination to areas where it is not found (Wood and Close 1974; Gray *et al.*, 1994; Milano de Tomasel and McIntyre, 2001).

In 2014, the National Phytosanitary Epidemiological Surveillance Program (Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria - ProVEF) of the SENASICA-SAGARPA in Jalisco, Mexico, carried out an alfalfa crop sampling by selecting plants with reduced growth, shortening of internodes, distortion and sprouts and leaves discolored. These symptoms are similar to those produced by foliar nematodes in alfalfa (Evans *et al.*, 2008), but in Mexico there was no evidence of its presence, hence the aim of determining the taxonomic and molecular identities of the nematodes found, as well as their phylogenetic affinities.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling of biological material

Sampling was carried out in the alfalfa crop var. Atoyac with a spraying irrigation system in Cuyacapan, Atoyac, Jalisco between coordinates 19.974489 °N - 103.5276407 °W. Seven samples of complete plants with roots, stems, sprouts, and

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo del material biológico

El muestreo se realizó en el cultivo de alfalfa var. Atoyac con sistema de riego por aspersión de la localidad Cuyacapan, Atoyac, Jalisco entre las coordenadas 19.974489° N - 103.5276407° W. Se colectaron siete muestras al azar de plantas completas con raíces, tallos, brotes y hojas con síntomas asociados a nematodos foliares.

### Extracción de nematodos

Raíces y follaje de las muestras fueron disecadas de 1-2 cm separando raíces, hojas+brotes y tallos e incubadas por separado por 4 h en agua destilada estéril a 20±2 °C. Se realizó la inspección de los nematodos extraídos de los tejidos con un microscopio estereoscópico American Optical con aumentos 1-15X.

### Identificación taxonómica

La determinación de la identidad de la especie asociada con el síndrome se llevó a cabo mediante taxonomía tradicional. Se realizaron las mediciones de los caracteres de diagnóstico, el cálculo de los Índices De Man y comparados con los valores de referencia de especies del género *Ditylenchus* mencionados por Hooper, 1972; Decker, 1969 y Sturhan & Brzeski 1991. Hembras y machos fueron anestesiados con calor de mechero de alcohol y posteriormente montados en agua-agar al 2% (Esser, 1986). Se tomaron fotografías con una cámara digital AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) adaptada a un microscopio compuesto AxioStar Plus (Carl Zeiss). Las mediciones fueron realizadas con el programa AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

leaves with symptoms related to foliar nematodes were collected randomly.

### Extraction of nematodes

Roots and foliage of the samples were dissected 1-2 cm long, and separated on roots, leaves+sprouts and stems. Samples were incubated separately for 4 h in sterile distilled water at 20±2 °C. The nematodes extracted from the tissues were inspected using a stereoscopic American Optical microscope with magnifications 1-15X.

### Taxonomic identification

The identity of the species related to the symptom was determined using traditional taxonomy. Measurements were taken of the diagnosis characteristics, as well as of the calculation of the De Man ratio Indices, and compared with the species reference values for the genus *Ditylenchus* mentioned by Hooper, 1972; Decker, 1969 and Sturhan & Brzeski 1991. Females and males were anesthetized with the heat from an alcohol burner and then placed on 2% water-agar (Esser, 1986). Photographs were taken using an digital AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) digital camera adapted to an AxioStar Plus (Carl Zeiss) compound microscope. The measurements were performed using the program AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

### DNA extraction

DNA was extracted using the method proposed by Williams *et al.*, 1992 and Thomas *et al.*, 1997 using the specimens previously analyzed using traditional taxonomy. Nematodes were recovered individually from the mounting medium and placed in 10 µl of lysis buffer solution (10 mM Tris-HCl,

## Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó a través del método propuesto por Williams *et al.*, 1992 y Thomas *et al.*, 1997 utilizando los especímenes previamente analizados por taxonomía tradicional. Los nematodos fueron recuperados individualmente del medio de montaje y colocados en 10 µl de solución amortiguadora de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.45% Tween 20; 0.05% gelatina) sobre un cubreobjetos limpio. Se maceró el espécimen con la punta de una micropipeta bajo el microscopio estereoscópico. Se transfirió la solución a un tubo de centrifuga de 200 µl y se congeló a -40 °C por 30 min. Se incubó a 65 °C por 1 h dando vortex al menos una vez y 0.1 µl de Proteinasa K (20 µg/ml) fue agregado faltando 10-15 min. Finalmente se incubó a 95°C por 15 min para inactivar la Proteinasa K y se conservó a -20 °C. Se utilizaron 5 µl del extracto crudo de ADN por cada reacción de PCR.

## Amplificación por PCR del ADN ribosomal

Se utilizaron dos marcadores moleculares del ADN ribosomal: 1. La región ITS1-5.8S-ITS2 empleando los iniciadores AB28 (5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3') (Joyce *et al.*, 1994) y TW81 (5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3') (Howlett *et al.*, 1992). 2. Los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S utilizando los iniciadores D2A (5'-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG-3') y D3B (5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3') (Ellis *et al.*, 1986; Courtright *et al.*, 2000). En ambos marcadores se utilizó ADN de *D. dipsaci* afectando ajo como control positivo.

Para la amplificación del ITS1-5.8S-ITS2, la reacción estuvo compuesta por solución amortiguadora de PCR 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Mix dNTP's 200 µM, iniciadores TW81 y AB28 a 0.4 µM,

pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.45% Tween 20; 0.05% gelatin) on a clean slide cover. The specimen was smashed using a micropipette tip under the stereoscopic microscope. The solution was transferred into a 200 µl centrifuge tube and frozen at -40°C for 30 min. It was incubated at 65°C for 1 h, vortexed at least once, and 0.1 µl of proteinase K (20 µg/ml) was added with 10-15 min remaining. Finally, it was incubated at 95 °C for 15 min to inactivate the Proteinase K and stored at -20 °C. For each PCR reaction, 5 µl of the crude DNA extract were used.

## Amplification by PCR of ribosomal DNA

Two molecular markers of the ribosomal DNA were used: 1. ITS1-5.8S-ITS2 region, using primers AB28 (5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3') (Joyce *et al.*, 1994) and TW81 (5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3') (Howlett *et al.*, 1992). 2. D2-D3 expansion segments of 28S gene, using primers D2A (5'-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG-3') and D3B (5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3') (Ellis *et al.*, 1986; Courtright *et al.*, 2000). For both markers, DNA from *D. dipsaci* affecting garlic was used as a positive control.

For the amplification of ITS1-5.8S-ITS2, the reaction was composed by PCR 1X (Invitrogen) buffer solution, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Mix dNTP's 200 µM, primers TW81 and AB28 at 0.4 µM, *Taq* Polymerase 2.5 U/µl and 5.0 µl DNA (crude extract). The PCR reactions took place in a total volume of 50 µl in an i-Cycler (BioRad) thermocycler with the following thermocycling program: initial denaturalization at 95 °C for 3 min, 34 denaturalization cycles at 95 °C for 45 s, annealing at 57 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1.5 min, and finally, a final extension at 72 °C for 5 min (Skantar *et al.*, 2007).

The amplification components of the expansion segments D2-D3 of gene 28S were: PCR 1X

*Taq* Polimerasa 2.5 U/μl y 5.0 μl DNA (extracto crudo). Las reacciones de la PCR se realizaron en un volumen total de 50 μl en un termociclador i-Cycler (BioRad) con el siguiente programa de termociclaje: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 34 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 s, anillamiento a 57 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1.5 min, y finalmente una extensión final a 72 °C por 5 min (Skantar *et al.*, 2007).

Los componentes de amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S fueron: solución amortiguadora de PCR 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Mix dNTP's 200 μM, iniciadores D2A y D3B a 0.4 μM, *Taq* Polimerasa 2.5 U/μl y 5.0 μl ADN considerando un volumen final de 50 μl. Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial 95 °C por 3 min, 34 ciclos de desnaturalización 95 °C por 45 s, anillamiento 55 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final 72 °C por 5 min (Marek *et al.*, 2010).

Los productos de PCR de ambos marcadores fueron corridos por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.4% teñido con GelRed (Biotium) y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BioRad).

#### PCR-RFLP's de la región ITS1-5.8S-ITS2

Los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción *RsaI* y *HinfI*. El volumen final de reacción fue de 20 μl con los siguientes componentes: 2 μl de solución amortiguadora de digestión, 1 μl de la enzima, 10 μl de producto de PCR y 7 μl de agua destilada estéril grado biología molecular. Se incubaron las muestras a 37 °C por 3 h y se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa ultrapura-1000 al 2.5% teñidos con GelRed (Biotium) y visualizados en el fotodocumentador Gel Doc EZ (BioRad).

(Invitrogen) buffersolution, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Mix dNTP's 200 μM, primers D2A and D3B at 0.4 μM, *Taq* Polymerase 2.5 U/μl and 5.0 μl DNA, considering a final volume of 50 μl. The thermocycling conditions were: initial denaturalization 95 °C for 3 min, 34 denaturalization cycles 95 °C for 45 s, annealing 55 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension 72 °C for 5 min (Marek *et al.*, 2010).

The products of PCR from both markers were run by horizontal electrophoresis in 1.4% agarose gel stained with GelRed (Biotium) and visualized in a Gel Doc EZ (BioRad) photodocumenter.

#### PCR-RFLP's of the ITS1-5.8S-ITS2 region

The amplified products were digested with restriction enzymes *RsaI* and *HinfI*. The final reaction volume was 20 μl with the following components: 2 μl of digestion buffer solution, 1 μl of the enzyme, 10 μl of PCR product and 7 μl of sterile molecular biology grade water. Samples were incubated at 37 °C for 3 h and analyzed by horizontal electrophoresis in 2.5% ultrapure agarose gel-1000 stained with GelRed (Biotium) and visualized in the Gel Doc EZ (BioRad) photodocumenter.

#### Sequencing, bioinformatics, and phylogenetic analysis

The PCR products amplified were sequenced using the Sanger method at National Phytosanitary Reference Center, SENASICA-SAGARPA. The "forward" and "reverse" sequences were assembled and edited, and primer sequences were eliminated using the program CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Co.).

Both ribosomal markers underwent a BLAST to determine homology with NCBI sequences.

## Secuenciación, bioinformática y análisis filogenético

Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados por el método de Sanger en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SENASICA-SAGARPA. Las secuencias “forward” y “reverse” fueron ensambladas, editadas y las secuencias de iniciadores eliminadas mediante el programa CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Co.).

A los dos marcadores ribosomales se realizó un BLAST para determinar homología con secuencias del NCBI. El análisis filogenético se realizó con una alineación múltiple de 36 secuencias de ITS1-5.8S-ITS2, mientras que para los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S el alineamiento múltiple incluyó 28 secuencias de especies cercanamente relacionadas con CLUSTAL W 2.3 (Thompson *et al.*, 1997). Para ambas reconstrucciones se utilizó *D. destructor* como grupo externo. La búsqueda del mejor modelo de sustitución nucleotídica se realizó en Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4 (Swofford, 1998). Para la inferencia bayesiana, se utilizó el programa MrBayes v.3.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001) mediante cuatro cadenas para 1,000,000 generaciones. En las cadenas de Markov se tomaron muestras a intervalos de 100 generaciones. Por cada análisis se ejecutaron dos corridas utilizando el modelo HKY+G para ambos marcadores. El primer 20% de los árboles muestreados fueron eliminados de todos los análisis y los árboles restantes fueron utilizados para calcular el árbol consenso por la regla de la mayoría del 50% y las probabilidades posteriores fueron calculadas para cada clado. Los árboles fueron visualizados con software FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las plantas presentaron síntomas de reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos,

Phylogenetic analysis was carried out with a multiple alignment of 36 sequences of ITS1-5.8S-ITS2, whereas D2-D3 expansion segments of the gene 28S, multiple alignment included 28 sequences of species closely with the software CLUSTAL W 2.3 (Thompson *et al.*, 1997). For both phylogenetic reconstructions, *D. destructor* was used as an external group. The search for the best model of nucleotidic substitution was carried out on Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) and PAUP 4 (Swofford, 1998). For the Bayesian inference, the program used was MrBayes v.3.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) with four chains for 1,000,000 generations. In the Markov chains, samples were taken at intervals of 100 generations. For each analysis, two runs were performed using the model HKY+G for both markers. The first 20% of the trees sampled were eliminated from all the analyses and the remaining trees were used to calculate the consensus tree by the rule of the majority of 50% and posterior probabilities were calculated for each clade. The trees were visualized using the software FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

## RESULTS AND DISCUSSION

All plants showed symptoms of growth reduction, shortening of internodes, and deformation of sprouts and leaves (Figure 1A) as well as decoloring of leaflets (albino leaves or “white flagging”) (Figure 1B). These symptoms, and particularly albino leaves, are similar to those caused by the stem nematode *D. dipsaci*, also been reported in the provinces of Alberta and British Columbia, Canada (Vrain and Lalik, 1983), and the states of Washington, Nevada, Utah, Alabama, and Wyoming, in the United States (Gray *et al.*, 1994).

In the incubation of roots, only free living nematodes were isolated, whereas in leaf, sprout and stem tissues, active specimens of the

deformación de brotes y hojas (Figura 1A) así como decoloración de folíolos (hojas albinas o “white flagging”) (Figura 1B). Estos síntomas y en particular las hojas albinas son similares a los ocasionados por el nematodo del tallo *D. dipsaci* los cuales también han sido reportados en las provincias de Alberta y Columbia Británica, Canadá (Vrain y Lalik, 1983), Washington, Nevada, Utah, Alabama y Wyoming, Estados Unidos de Norteamérica (Gray *et al.*, 1994).

En la incubación de raíces sólo se aislaron nematodos de vida libre mientras que en los tejidos de hojas, brotes y tallos se obtuvieron especímenes activos del género *Ditylenchus*. Si bien se detectaron nematodos vivos (~90-100/g de muestra), también se detectaron especímenes en anhidrobiosis (~15-20). Tomando en consideración que esta especie puede sobrevivir de esta forma en residuos de cosecha, semilla botánica y partículas de suelo, los especímenes pueden reactivarse y servir como fuente de inóculo para infecciones futuras o introducirse en zonas donde no se encuentre presente (Wharton y Barrett, 1985).

genus *Ditylenchus* were obtained. Although live nematodes were found (~90-100/g of sample), specimens were also found in anhydrobiosis stage (~15-20). Considering that this species can survive in this way on harvest residues, botanical seeds, and soil particles, the specimens may reactivate and serve as a source of inoculum for future infections or introduce itself into areas in which it was not previously present (Wharton and Barrett, 1985).

**Taxonomic identification:** The specimens found displayed the following characteristics: **Females:** thin body (Figure 2 A), cephalic area slightly flattened, glandular area with a slight or no overlap, muscular middle bulb with a well-defined valve. Small and weak stylet with well-developed nodules (Figure 2 B), post-uterine sac with a length  $\frac{1}{2}$  of that between the vulva and the anus (Figure 2 D). **Males:** thin body (Figure 2 F), relatively smaller than females; simple spicules, moderate gubernaculum, and leptoderan bursa type that covers approximately 75% tail length (Figure 2 E). Both in females and males, a lateral field



**Figura 1.** Síntomas producidos por el nematodo del tallo *D. dipsaci* en alfalfa. A) Deformación de hojas brotes y acortamiento entrenudos. B) Decoloración de folíolos (“hojas albinas”).

**Figure 1.** Symptoms produced by the stem nematode *D. dipsaci* in alfalfa. A) Deformation of leaves, sprouts and shortening of internodes. B) Decoloring of leaflets (“albino leaves”).

**Identificación taxonómica:** Los especímenes detectados presentaron las siguientes características: **Hembras:** cuerpo delgado (Figura 2A), región cefálica baja ligeramente aplanada, región glandular sin sobreposición marcada o muy ligera, bulbo medio muscular con válvula bien definida. Estilete pequeño y débil con nódulos bien desarrollados (Figura 2B), saco post-uterino con una longitud de  $\frac{1}{2}$  de la distancia entre la vulva y el ano (Figura 2D). **Machos:** cuerpo delgado (Figura 2F), relativamente más pequeños que las hembras; espículas y gubernaculum simple de tamaño moderados y con bursa tipo leptoderan que cubre aproximadamente el 75% de la cola (Figura 2E). Tanto en hembras como en machos se observó un campo lateral con cuatro incisuras (Figura 2C) y cola cónica aguda con terminación en punta de lápiz (Figuras 2A, E y F). Estas características morfológicas corresponden al género *Ditylenchus*. La morfometría y los Índices De Man obtenidos concuerdan con los valores de referencia reportados por Decker, 1969; Hooper, 1972 y Sturhan & Brzeski 1991 para el nematodo de la alfalfa *D. dipsaci* (Cuadro 1).

**Identificación molecular:** La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del DNA ribosomal produjeron un fragmento de aproximadamente 750 pb (Figura 3) y 800 pb, respectivamente (Figura 4), el cual coincide con el reportado por Subbotin *et al.*, 2005. Estas secuencias fueron depositadas en la base de datos del NCBI con los números de acceso KY348762, KY348763 y KY348764 para ITS1-5.8S-ITS2 y KY348765 para D2-D3 del gen 28S.

**Digestión enzimática PCR-RFLPs:** La digestión del producto de PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 con la enzima *RsaI* se produjeron 4 fragmentos: 335, 280, 200 y 132 pb (Figura 5) y con *HinfI* se obtuvieron dos fragmentos: 400 y 300 pb (Figura 6). El

was observed with four incisures (Fig. 2 C) and a sharp conical tail ending in the shape of a pencil tip (Figuras 2 A, E, and F). These morphological characteristics correspond to the genus *Ditylenchus*. The morphometry and De Man ratio obtained agree with the reference values reported by Decker, 1969; Hooper, 1972 and Sturhan & Brzeski 1991 for the alfalfa nematode *D. dipsaci* (Table 1).

**Molecular identification:** The amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region and D2-D3 expansion segments of 28S gene of the ribosomal DNA produced a fragment of approximately 750 bp (Figure 3) and 800 bp, respectively (Figure 4), which coincides with that reported by Subbotin *et al.*, 2005. These sequences were deposited in the NCBI database with access numbers KY348762, KY348763, and KY348764 for ITS1-5.8S-ITS2 and KY348765 for D2-D3 of the gene 28S.

**PCR-RFLPs enzymatic digestion:** The digestion of the PCR product of ITS1-5.8S-ITS2 region with the enzyme *RsaI* produced four fragments: 335, 280, 200 and 132 bp (Figure 5) and with *HinfI*, two fragments were produced: 400 and 300 bp (Figure 6). The digestion pattern agreed with the one presented by the bulb nematode *D. dipsaci* in garlic for both enzymes (Subbotin *et al.*, 2003; Vovlas *et al.*, 2011). However, the digestion pattern for the nematode *D. dipsaci* found in alfalfa with the enzyme *RsaI* showed an additional fragment of 200 bp (Figure 5). This 200 bp fragment indicated the differentiation of the population of the nematode found in alfalfa in regard to the population that affects garlic.

**Phylogenetic analysis.** The search for homology by BLAST of the Mexican sequences of *D. dipsaci* found in alfalfa with sequences of the NCBI from both markers of the rDNA previously deposited in

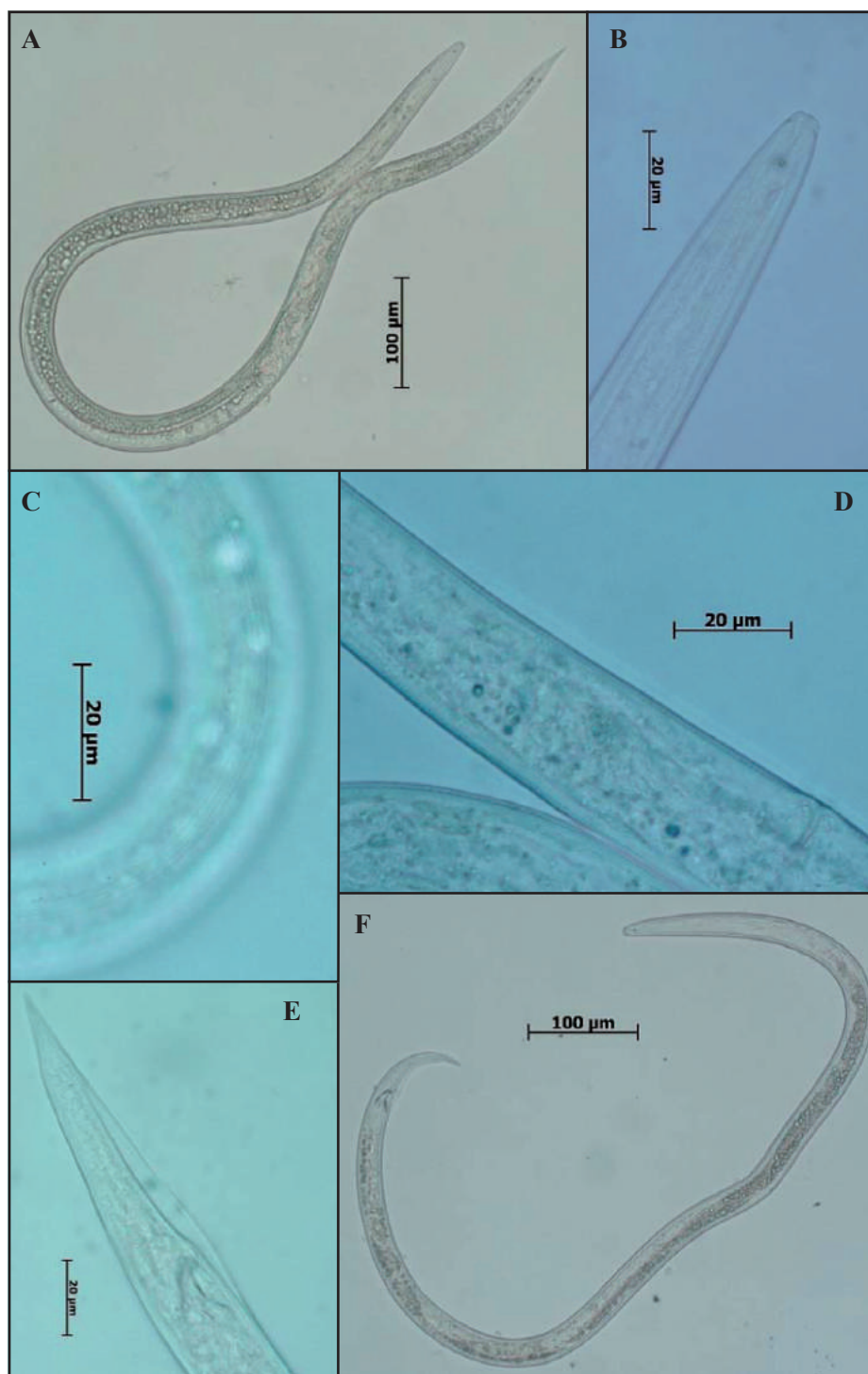


Figura 2. Micrografías de caracteres de diagnóstico para nematodos detectados en alfalfa. A) hembra, B) región anterior y estilete, C) Cuatro campos laterales, D) saco post-uterino, E) cola aguda y bursa *leptoderan.*, y F) macho.

Figure 2. Micrographs of diagnosis characteristics for nematodes found in alfalfa. A) female, B) anterior end and stylet, C) Four lateral fields, D) post-uterine sac, E) sharp conical tail ending and *leptoderan* bursa type, F) male.



**Cuadro 1. Morfometría de especímenes de *Ditylenchus* detectados en plantas de alfalfa. Todos los valores están dados en mm excepto V y T, los cuales están dados en porcentaje. Promedio ± Desviación estandar, y valores mínimos-máximos.**

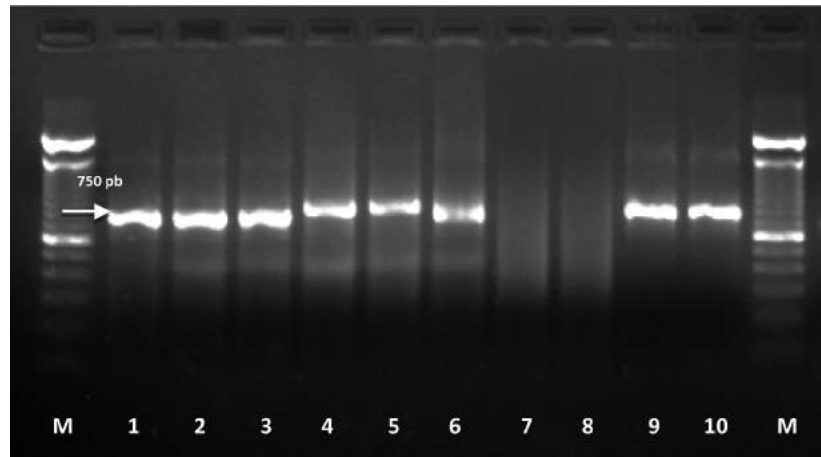
**Table 1. Morphometry of *Ditylenchus* found in alfalfa plants. All values are expressed in mm except V and T, which are expressed as percentages. Average ± Standard deviation and minimum-maximum values.**

| xCaracter morfométrico/<br>Índices De Man             | yValores de especímenes<br>detectados en Alfalfa |                                | yValores de referencia para <i>D. dipsaci</i><br>(Hopper, 1972; Decker, 1969);<br>Sturhan & Brzeski 1991) |             |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                                                       | ♀ n=10                                           | ♂ n=15                         | ♀                                                                                                         | ♂           |
| L                                                     | 1190.4±123.6<br>(1056.7-1418.0)                  | 1109.4±101.5<br>(957.3-1260.0) | 1000 - 1700                                                                                               | 1000 - 1500 |
| Ancho máximo cuerpo                                   | 30.8±2.2<br>(28.0-34.6)                          | 27.0±2.3<br>(23.6-30.0)        | *                                                                                                         | *           |
| Longitud estilete                                     | 10.1±0.5<br>(9.5-10.8)                           | 9.9±0.2<br>(9.5-10.1)          | 10-13                                                                                                     | 9-12        |
| Long esófago                                          | 172.3±17.8<br>(134.3-219.4)                      | 178.4±20.4<br>(153.4-215.0)    | *                                                                                                         | *           |
| Longitud cola                                         | 90.1±12.4<br>(77.3-111.1)                        | 85.7±4.3<br>(80.1-93.1)        | 95-105                                                                                                    | *           |
| Longitud saco post-uterino (PUS)                      | 63.9±11.5<br>(46.9-82.5)                         | -                              | 1/2 la distancia<br>vulva-ano                                                                             | -           |
| Distancia vulva-ano                                   | 143.6±23.4<br>(94.2-176.4)                       | -                              | 1 3/4-2 1/4 la longitud<br>de la cola                                                                     | -           |
| Long. región cefálica-vulva                           | 952.6±90.5<br>(844.2-1154.8)                     | -                              | *                                                                                                         | -           |
| Relación entre long. de vulva-ano/long.<br>PUS        | 2.3±0.5<br>(1.7-3.2)                             | -                              | 2.0                                                                                                       | -           |
| Longitud espícula                                     | -                                                | 21.4±1.9<br>(19.1-24.0)        | -                                                                                                         | 20-28       |
| Longitud gubernáculo                                  | -                                                | 7.5±1.0<br>(6.4-9.0)           | -                                                                                                         | 8-11        |
| Long. de cloaca a parte más alejada del<br>testículo. | -                                                | 672.1±116.2<br>(491.9-801.4)   | -                                                                                                         | *           |
| <i>a</i>                                              | 38.7±3.2<br>(33.4-46.4)                          | 41.2±2.3<br>(38.0-43.7)        | 30.2-64                                                                                                   | 35.4-53.5   |
| <i>b</i>                                              | 7.0±0.7<br>(6.0-8.4)                             | 6.3±0.7<br>(5.5-7.4)           | 6.0-8.8                                                                                                   | 5.5-7.8     |
| <i>c</i>                                              | 13.3±1.0<br>(11.1-15.3)                          | 12.9±1.0<br>(11.9-14.7)        | 13.3-19.5                                                                                                 | 12-17.3     |
| V                                                     | 80.0±1.2<br>(78.9-82.2)                          | -                              | 79-86                                                                                                     | -           |
| T                                                     | -                                                | 61.0±11.2<br>(39.0-69)         | -                                                                                                         | 65-72       |

xL=longitud del cuerpo; a=L/ancho máximo del cuerpo; b=L/longitud esófago; c=L/longitud cola; V = distancia de la región anterior a la vulva/L x 100; T=Distancia desde la cloaca a la parte más alejada del testículo/L x100. / L=Total body length; a=L/Greatest body width; b=L/ Oesophagus length; c=L/tail length; V = Anterior end-vulva length/L x 100; T=Distance from cloaca to anterior-most part of testis/L x100.

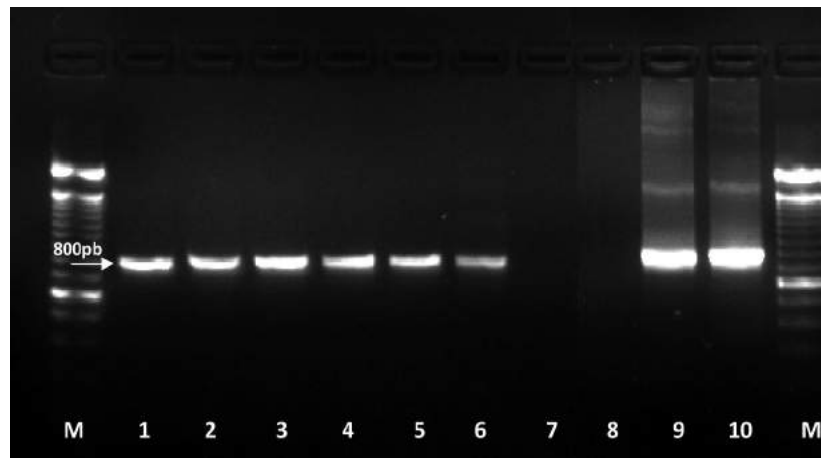
♀ = Hembras, ♂ = Machos / ♀ = Females, ♂ = Males

y- = No aplica, \* = Valor no disponible en literatura. / y- = Not applicable, \* = Value not available in literature.



**Figura 3.** Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA de *D. dipsaci* detectado en alfalfa. M: marcador molecular de 100 pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci*; 7 y 8: controles negativos (agua estéril grado biología molecular); 9 y 10: controles positivos de *D. dipsaci* (ajo) amplificando en un fragmento de 750 pb.

**Figure 3.** Amplification of rDNA ITS1-5.8S-ITS2 region of *D. dipsaci* found in alfalfa. M: 100 bp molecular marker; 1-6: amplified from the individual DNA extraction of *D. dipsaci*; 7 and 8: negative controls (molecular biology grade sterile water); 9 and 10: positive controls for *D. dipsaci* (garlic) amplifying a fragment of 750 bp.



**Figura 4.** Amplificación de segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA. M: marcador molecular de 100 pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci*; 7 y 8: controles negativos (agua estéril grado biología molecular); 9 y 10: controles positivos de *D. dipsaci* (ajo) amplificando en un fragmento de 800 pb.

**Figure 4.** Amplification of D2-D3 expansion segments of 28S gene. M: 100 bp molecular marker; 1-6: amplified from the individual DNA extraction of *D. dipsaci*; 7 and 8: negative controls (molecular biology grade sterile water); 9 and 10: positive controls for *D. dipsaci* (garlic) amplifying a fragment of 800 bp.

patrón de digestión coincide con el presentado por el nematodo de los bulbos *D. dipsaci* en ajo para ambas enzimas (Subbotin *et al.*, 2003; Vovlas *et al.*, 2011) sin embargo, el patrón de digestión del

the GenBank displayed a 99% homology ( $E=0.0$ ) with *D. dipsaci* sequences from different hosts and areas.

The topology of the phylogenetic tree obtained

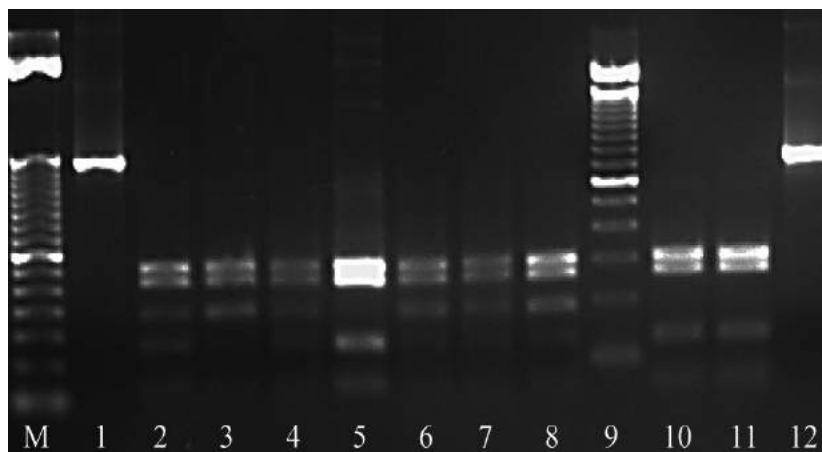


Figura 5. Digestión enzimática de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA con la enzima *RsaI*. M: marcador molecular de 50 pb; 1 y 12: Producto de PCR sin digerir; 2-4, 6-8: Patrón de restricción 335, 280, 200 y 132 pb, de *D. dipsaci* en alfalfa. 5, 10 y 11: Control positivo de *D. dipsaci* (ajo) patrón de restricción 335, 280 y 132 pb; 9: marcador molecular 100 pb.  
Figure 5. Enzymatic digestion of ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA with the enzyme *RsaI*. M: 50 bp molecular marker; 1 and 12: Undigested PCR product; 2-4, 6-8: Restriction pattern 335, 280, 200 and 132 bp of *D. dipsaci* in alfalfa. 5, 10 and 11: Positive control of *D. dipsaci* (garlic) restriction pattern 335, 280 and 132 bp; 9: 100 bp molecular marker.

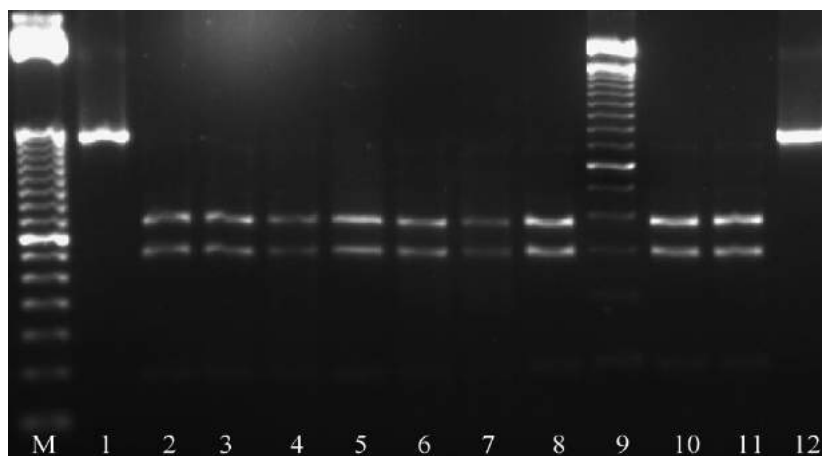


Figura 6. Digestión enzimática de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA con la enzima *HinfI*. M: marcador molecular de 50 pb; 1 y 12: Producto PCR sin digerir; 2-8: Patrón de restricción 400 y 300 pb, 9: marcador molecular 100 pb. 10 y 11: Patrón de restricción de *D. dipsaci* s.s.(ajo) de 400 y 300 pb.  
Figure 6. Enzymatic digestion of ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA with the enzyme *HinfI*. M: 50 bp molecular marker; 1 and 12: Undigested PCR product; 2-8: Restriction pattern 400 and 300 bp, 9: 100 bp molecular marker. 10 and 11: Restriction pattern for *D. dipsaci* s.s.(garlic) of 400 and 300 bp.

nematodo *D. dipsaci* detectado en alfalfa con la enzima *RsaI* mostró un fragmento adicional de 200 pb (Figura 5). Este fragmento de 200 pb indicó la

with marker ITS1-5.8S-ITS2 positioned *D. dipsaci* in two large groups, based on karyotypic differences: the diploid and the polyploid. The

diferenciación de la población del nematodo detectado en alfalfa respecto a la población que afecta ajo.

**Análisis filogenético.** La búsqueda de homología por BLAST de las secuencias mexicanas de *D. dipsaci* detectadas en alfalfa con secuencias del NBCI de ambos marcadores del rDNA previamente depositadas en el GenBank mostraron un 99% de homología ( $E=0.0$ ) con secuencias de *D. dipsaci* de diferentes hospederos y regiones.

La topología del árbol filogenético obtenido con el marcador ITS1-5.8S-ITS2, posicionó a *D. dipsaci* en dos grandes grupos basados en diferencias cariotípicas: el diploide y el poliploide. La población mexicana de *D. dipsaci* en alfalfa, se agrupó en el clado *sensu stricto* diploide de *D. dipsaci* (Figura 7) donde se observa una baja diversidad haplotípica y poca variación intraespecífica. Si bien las poblaciones mexicanas se agrupan en un clado bien definido, es evidente la presencia de haplotipos diferentes de *D. dipsaci* en alfalfa. En este clado se ubican casi todas las razas fisiológicas de *D. dipsaci* basadas en los hospedantes que afecta. Un agrupamiento parecido fue observado con el marcador D2-D3 del gen 28S en ambos marcadores (Figura 8). Esta topología es similar a la reportada para miembros de la familia Anguinidae utilizando diferentes marcadores del rDNA (Subbotin *et al.*, 2003; Subbotin *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2007; Jeszke *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

En México, *D. dipsaci* afecta ajo y cebolla en las principales zonas productoras de estas aliáceas (Tenente, 1996; SENASICA, 2013). Estudios realizados con hospederos diferenciales para la determinación de razas, afirman que tales poblaciones

Mexican population of *D. dipsaci* in alfalfa was grouped in the clade *sensu stricto* *D. dipsaci* diploid (Figure 7), which shows a low haplotype diversity and little intraspecific variation. Although Mexican populations are grouped in a well-defined clade, the presence of different *D. dipsaci* haplotypes in alfalfa is evident. This clade get together almost all the physiological races of *D. dipsaci* based on the hosts affected. A similar grouping was observed with marker D2-D3 of the gene 28S (Figure 8). This topology is similar to that reported for members of the Anguinidae family using different rDNA markers (Subbotin *et al.*, 2003; Subbotin *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2007; Jeszke *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONS

In Mexico, *D. dipsaci* affects garlic and onion plants in the main geographic areas that produce these alliacous crops (Tenente, 1996; SENASICA, 2013). Studies carried out on differential hosts for the determination of races, claim that such correspond to the “garlic race” (Aguilera, 1994). The pathogenic variability of *D. dipsaci* manifested in several races is well-known based on the host it affects, and therefore, based on the host and the PCR-RFLP restriction pattern obtained with the endonuclease *RsaI*, it is possible to indicate that the foliar nematode *D. dipsaci* found in this host could be the “alfalfa race,” since this race only affects, and reproduces in *Medicago sativa* plants (Webster, 1967; Sturhan and Brzesky, 1991; Riggs, 1991). It is necessary to carry out studies of differential hosts in the populations that affect alfalfa and use genomic tools as high throughput sequencing (Next Generation Sequencing) to obtain useful molecular markers for the differentiation of the *D. dipsaci* races in Mexico.

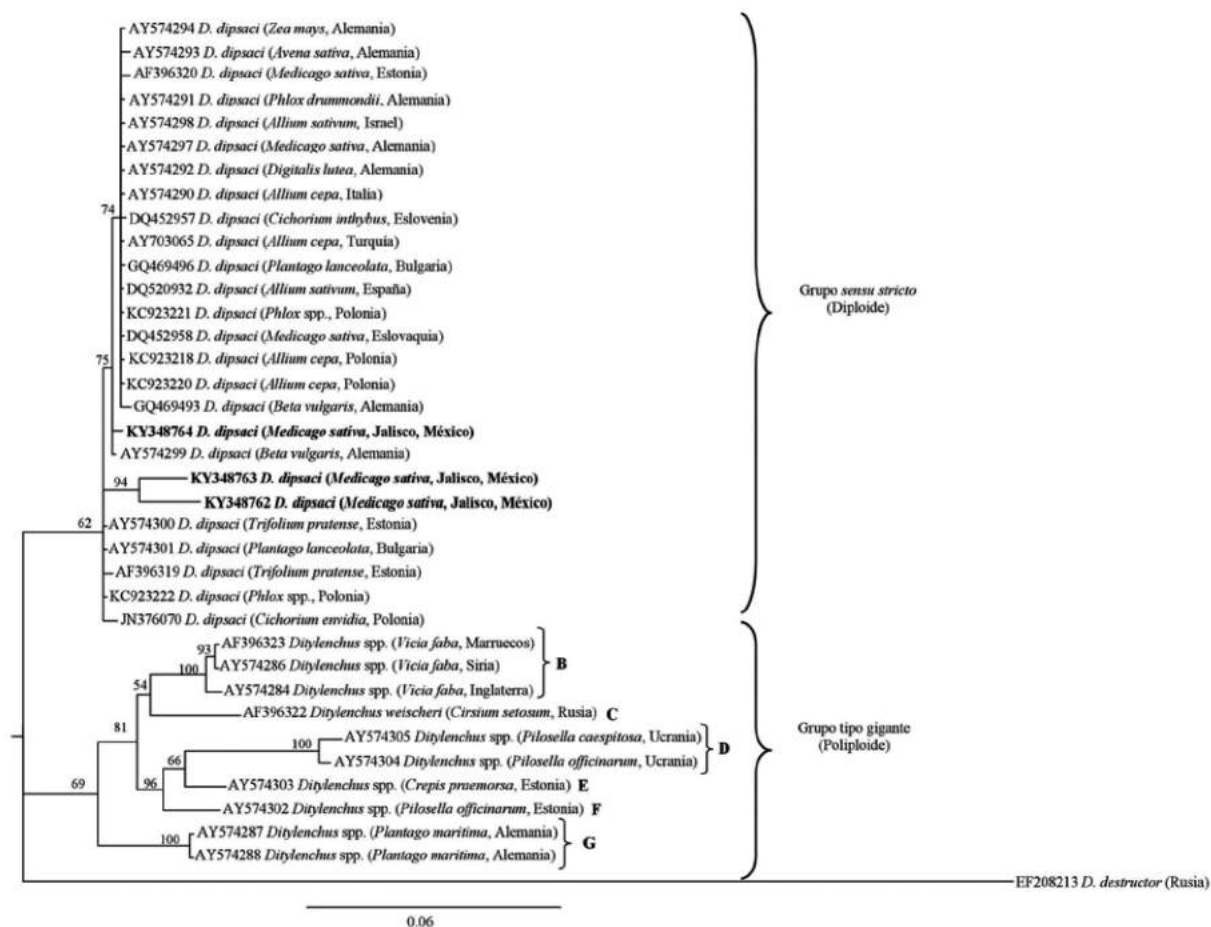


Figura 7. Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de la población mexicana de *D. dipsaci* detectado en alfalfa. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% generados a partir del modelo complejo: HKY + G, con otras secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Valores de soporte son indicados en cada una de los clados.

Figure 7. Bayesian phylogenetic reconstruction of ITS1-5.8S-ITS2 region sequences from Mexican population of *D. dipsaci* found in alfalfa. Superior probability consensus tree 50% generated from the complex model: HKY + G, with other anguinid sequences deposited in GenBank. Support values are indicated in each one of the clades.

corresponden a la “raza ajo” (Aguilera, 1994). Es conocida la gran variabilidad patogénica de *D. dipsaci* manifestada en varias razas en base al hospedero que afecta por ello, con base al hospedante y al patrón de restricción PCR-RFLP obtenido con la endonucleasa *RsaI* se puede indicar que el nematodo foliar *D. dipsaci* detectado en este hospedante

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to the National Phytosanitary Epidemiological Surveillance Program (ProVEF) of the SENASICA-SAGARPA in Jalisco, Mexico for its support during the collection of samples.

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

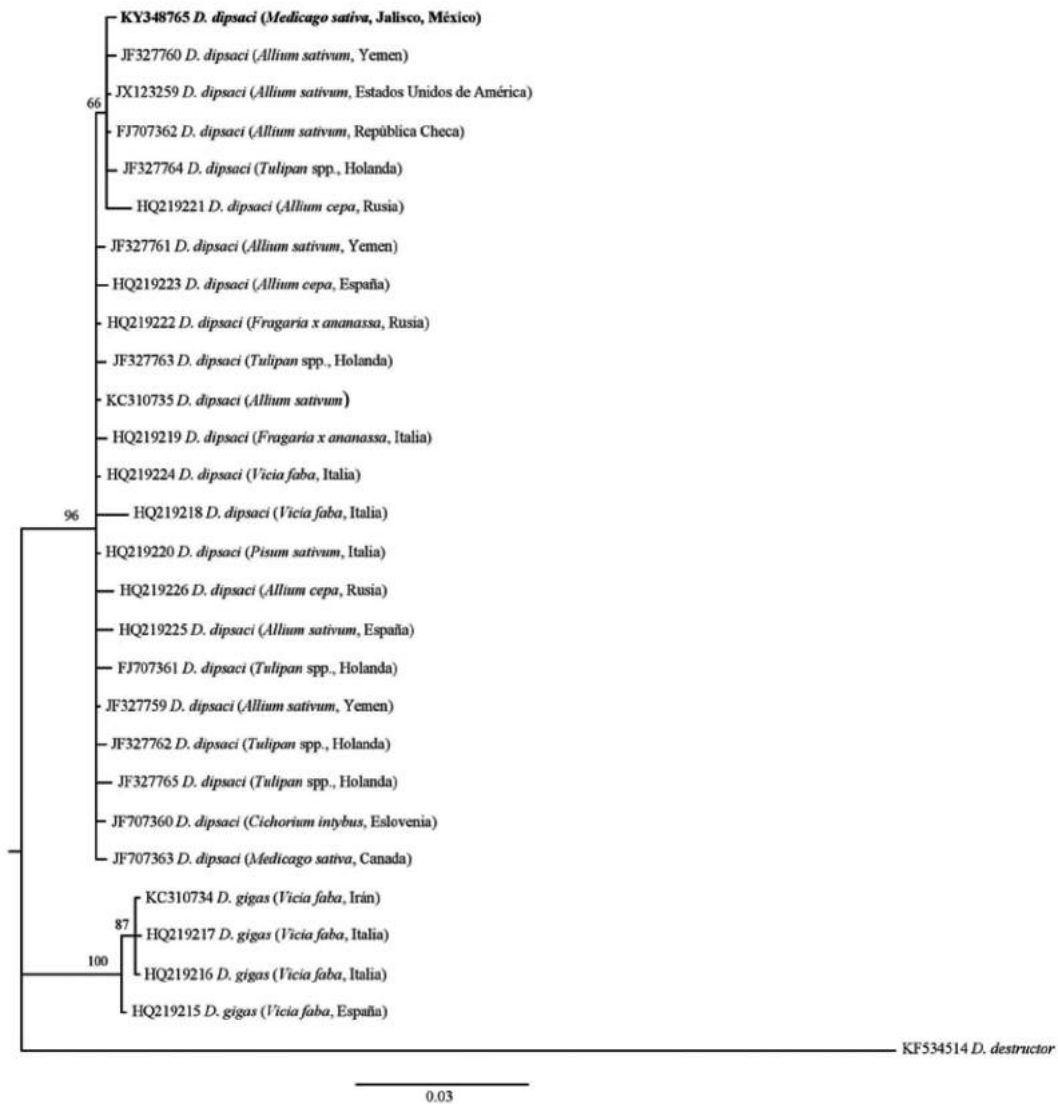


Figura 8. Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S de la población mexicana de *D. dipsaci* detectado en alfalfa. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% generados a partir del modelo complejo: HKY + G, con otras secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Valores de soporte son indicados en cada una de los clados.

Figure 8. Bayesian phylogenetic reconstruction of D2-D3 expansion segments of 28S gene sequences from Mexican population of *D. dipsaci* found in alfalfa. Superior probability consensus tree 50% generated from the complex model: HKY + G, with other anguinid sequences deposited in GenBank. Support values are indicated in each one of the clades.

podría tratarse de la “raza alfalfa” debido a que esta raza únicamente afecta y se reproduce en plantas de *Medicago sativa* (Webster, 1967; Sturhan y Brzesky, 1991; Riggs, 1991). Es necesario realizar

estudios de hospedantes diferenciales de la población que afecta alfalfa y hacer uso de herramientas genómicas como tecnologías de secuenciación de masiva (Next Generation Sequencing) para obtener

marcadores moleculares que sean de utilidad para la diferenciación de las razas de *D. dipsaci* presentes en nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (ProVEF) del SENASICA-SAGARPA en Jalisco, México por el apoyo durante las actividades de colecta de muestras.

LITERATURA CITADA

- Aguilera AWH. 1994. Identificación de razas del nematodo *Ditylenchus dipsaci* presentes en México. Tesis Profesional, UAM-X. 21 p.
- Boelter RH, Gray FA and Delaney RH. 1985. Effect of *Ditylenchus dipsaci* on Alfalfa mortality, winterkill, and yield. *Journal of Nematology* 17:140-144. <http://journals.fcla.edu/jon/article/viewFile/65631/63299>
- Castillo P., Vovlas N., Azpilicueta A., Landa B.B. and Jiménez-Díaz R.M. 2007. Host-parasite relationships in fall-sown sugar beets infected by the stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*. *Plant Disease* 91:71-79. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-91-0071>
- Caubel G. and Pedron D. 1976. Distribution géographique du nématode des tiges *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Fil., en culture de légumineuses fourragères. *Sciences Agronomiques Rennes* 8:183-188.
- Courtright EM, Wall DH, Virginia RA, Frisse LM, Vida JT and Thomas WK. 2000. Nuclear and mitochondrial DNA sequence diversity in the antarctic nematode *Scottinema lindsayae*. *Journal of Nematology* 32: 143-153. <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/67138/64806>
- Chew MYI. 2000. Enfermedades de la Alfalfa. Pp: 47-57. In: Núñez HG, Chew MYI, Reyes JI y Godina GHJ (eds.). Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México. INIFAP Centro de Investigación Regional Norte Centro. México. 102 p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1938/produccionyutilizaciondelaalfalfaenlazonanortedemexico.pdf?sequence=1>
- Duncan WL and Moens M. 2006. Migratory endoparasitic nematodes. Pp: Perry RN and Moens M. (eds.). 144-166. In: *Plant Nematology*. CABI, UK. 541p.
- Decker H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, Germany. 526p.
- Esser RP. 1986. A water agar en face technique. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 53:254-255. Disponible en línea: <http://bionames.org/bionames-archiv/issn/0018-0130/53/254.pdf>
- Ellis RE, Sulston JE and Coulson AR. 1986. The rDNA of *C. elegans*: Sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 14:2345-2364. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC339662/pdf/nar00274-0410.pdf>
- Evans K., Israelsen C. and Pace M. 2008. Alfalfa Stem Nematode. Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory. Utah, USA. 3 p. Disponible en línea: <https://utahpests.usu.edu/upddl/files-ou/factsheet/alfalfa-stem-nematode08.pdf>
- Gray FA, Williams JL, Griffin GD and Wilson TE. 1994. Distribution in the Western United States on alfalfa and cultivar Reaction to mixed populations of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi*. *Journal of Nematology* 26:705-719. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619569/pdf/705.pdf>
- Griffin GD and Thyr BD. 1988. Interaction of *Meloidogyne hapla* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* on alfalfa. *Phytopathology* 78:421-425. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n04_421.PDF
- Hooper DJ. 1972. *Ditylenchus dipsaci*. C.I.H. Description of Plant Parasitic Nematodes. Set 1, No. 14.
- Howlett BJ, Brownlee AG, Guest DI, Adcock GJ, and McFadden GI. 1992. The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megasperma* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22: 455-461. DOI:10.1007/BF00326410
- Huelsensbeck J and Ronquist F. 2001. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Jeszke A, Budziszewska M, Dobosz R, Stachowiak A, Protasiewicz D, Wieczorek P and Obrepalska-Stęplowska A. 2014. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland. *Journal of Phytopathology* 162: 61-67. DOI: 10.1111/jph.12161
- Joyce SA, Reid A, Driver F and Curran J. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. Pp:178-187. In: Burnell AM, Ehlers RU. and Masson JP. (eds.). COST 812 Biotechnology Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complexes. Proceedings of Symposium & Workshop, St. Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland.
- Kerkoud M, Esquibet M, Plantard O. *et al.*, 2007. Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Journal of Plant Pathology* 118: 323-332. DOI: 10.1007/s10658-006-9092-6
- Lara MCR, y Jurado GP. 2014. Paquete tecnológico para producir alfalfa en el estado de Chihuahua. Centro de Investigación Regional Norte Centro, INIFAP. Chihuahua, México. 48 p. Disponible en línea: http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/8/2013/anales/anu_2413-25-2014-05-6.pdf
- Marek M, Zouhar M, Douda O, Mazakova J. and Rysanek P. 2010. Bioinformatics-assisted characterization of the ITS1-5.8S-ITS2 segments of nuclear rRNA gene clusters, and its exploitation in molecular diagnostics of European crop-parasitic nematodes of the genus *Ditylenchus*. *Plant Pathology* 59: 931-934. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02322.x

- Milano de Tomasel MC, and McIntyre GA. 2001. Distribution and biology of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* in alfalfa grown in Colorado. *Nematropica* 31:11–16. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69608/67268>
- Nylander J. 2004. MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Perera M, Taylor S, Vanstone V and Jones M. 2009. Protein biomarkers to distinguish oat and lucerne races of the stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*, with quarantine significance for Western Australia. *Nematology* 11:555-563. <https://doi.org/10.1163/138855409X12465362560557>
- Qiao Y, Yu Q, Badiss A, Zaidi MA, Ponomareva E, Hu Y, and Ye W. 2016. Paraphyletic genus *Ditylenchus* Filipjev (Nematoda, Tylenchida), corresponding to the *D. trifurmis*-group and the *D. dipsaci*-group scheme. *ZooKeys* 568: 1–12. DOI: 10.3897/zookeys.568.5965
- Rambaut A. 2009. FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Riggs RD. 1991. Resistance-breaking races of plant parasitic nematodes. Pp. 827-854. In: Manual of Agricultural Nematology. Nickle, W. R. (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York, USA. 1025 p.
- SENASICA, 2013. Nematodo de los tallos y de los bulbos (*Ditylenchus dipsaci* Kühn 1857). Dirección General de Sanidad Vegetal-Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México. Ficha Técnica No. 18. 24 p. Disponible en línea: <http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/FTNo.18nematododeltalloydelosbulbos2.pdf>
- Skantar AM, Handoo ZA, Carta LK, and Chitwood DJ. 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39:133-144. Disponible en línea: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/990/Skantar%20Chitwood%20Idaho%20Globodera%20pallida%202007reduced.pdf>
- Sturhan D and Brzeski MW. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. Pp. 423–464. In: Nickle WR (ed.). Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, Inc., New York (USA). 1064 p.
- Swofford D. 1988. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b8a. Sunderland, MA: Sinauer.
- Subbotin SA, Madani M, Krall EL, Sturhan D and Moens M. 2003. Identification and phylogenetic relationships within the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* complex (Tylenchida: Anguinidae) as inferred from analysis of the ITS-rDNA sequences. *Journal of Nematology* 35:365. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/67424/65092>
- Subbotin SA, Madani M, Krall E, Sturhan D and Moens M. 2005. Molecular diagnosis, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathology* 95:1308–1315. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-1308>
- Subbotin SA and Riley IT. 2012. Stem and gall forming nematodes. Pp. 521-577. In: Manzanilla-Lopez RH and Marban-Mendoza N. (eds.). Practical Plant Nematology. Biblioteca Básica de Agricultura. Colegio de Postgraduados (México). 883 p.
- Tenente RCV.1996. Nematode problems of bulbs, with special reference to *Ditylenchus dipsaci*. *Nematropica* 26:91-99. <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64150/61818>
- Tenuta M, Madani M, Briar S, Molina O, Gulden R, and Subbotin SA. 2014. Occurrence of *Ditylenchus weischeri* and not *D. dipsaci* in field pea harvest samples and *Cirsium arvense* in the Canadian Prairies. *Journal of Nematology* 46:376–384. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284090/pdf/376.pdf>
- Thies JA, Barnes DK, Rabas DL, Sheaffer CC and Wilcoxson RD. 1992. Seeding Date, Carbofuran, and Resistance to Root-Lesion Nematode Affect Alfalfa Stand Establishment. *Crop Sciences* 32:786-792. DOI:10.2135/cropsci1992.0011183X003200030042x
- Thomas WK, Vida JT, Frisse LM, Mundo M and Baldwin JG. 1997. DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29:250-254. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619797/pdf/250.pdf>
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-82. DOI: 10.1093/nar/25.24.4876
- Vovlas N, Troccoli A, Palomares-Rius JE, De Luca F, Liébanas G, Landa BB, Subbotin SA and Castillo P. 2011. *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology* 60: 762-775. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2011.02430.x/epdf>
- Vrain TC and Lalik B. 1983. Distribution and pathogenicity of the Alfalfa Stem Nematode, *Ditylenchus dipsaci*, in British Columbia. *Plant Disease* 67:300-302. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n03_300.PDF
- Webster JM. 1967. The significance of biological races of *Ditylenchus dipsaci* and their hybrids. *Annals of Applied Biology* 59: 77-83. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1967.tb04418.x
- Wharton DA and Barrett J. 1985. Ultrastructural changes during recovery from anabiosis in the plant parasitic nematode, *Ditylenchus*. *Tissue Cell* 17:79-96. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166\(85\)90017-5](http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166(85)90017-5)
- Wharton DA, Rolfe RN and Perry R.N. 2000. Electrophysiological activity during recovery from anhydrobiosis in fourth stage juveniles of *Ditylenchus dipsaci*. *Nematology* 2:881-886. DOI: 10.1163/156854100750112824
- Wendt KR, Vrain TC and Webster JM. 1993. Separation identification of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology* 25: 555-563. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view-File/66542/64210>
- Westerdahl B, Goodell P, and Hafez S. 2006. Alfalfa nematodes. UC IPM Pest Management Guidelines for alfalfa. Disponible en línea: <http://ipm.ucdavis.edu/PMG/r1200111.html>

Williams BD, Schrank B, Huynh C, Shownkeen R and Waterston RH. 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131: 609-624. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1205034/pdf/ge1313609.pdf>

Wood FH and Close RC. 1974. Dissemination of lucerne stem nematode in New Zealand. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 2:79-82. DOI:10.1080/03015521.1974.10427674

Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.) fruit in Mexico

Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México

Isabel Cruz-Lachica, Isidro Márquez-Zequera, Raymundo Saúl García-Estrada, José Armando Carrillo-Fasio, Josefina León-Félix, Raúl Allende-Molar*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Culiacán. Km 5.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80110. *Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Recibido: 08 de Noviembre, 2016.

Aceptado: 03 de Julio, 2017.

Cruz-Lachica I, Márquez-Zequera I, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Allende-Molar R. 2017. Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.) fruit in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 397-417.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1611-3

Primera publicación DOI: 03 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 03, 2017.

Resumen. México es uno de los principales productores de papaya a nivel mundial; sin embargo, la producción es afectada por enfermedades fúngicas, siendo la pudrición blanda de frutos una causa de pérdidas en precosecha y en poscosecha. La enfermedad es común; sin embargo, la información acerca de los agentes causales es escasa. El objetivo de este trabajo fue identificar a los hongos mucorales causantes de pudrición blanda mediante caracterización morfológica y molecular. Se recolectaron frutos enfermos durante el periodo mayo-octubre de 2014 en Colima, Veracruz y Oaxaca. Se

Abstract. México is one of the main papaya producers worldwide; however, yield is affected by fungal diseases such as the fruit soft rot, which causes preharvest and postharvest losses. Although it is a common disease, information related to the identification of the causal agents is scarce. The objective in this study was to identify by morphological and molecular techniques the species of mucoralean fungi responsables of papaya soft rot. Diseased fruits were collected during May-October 2014 in production regions in Colima, Veracruz, and Oaxaca. Mucoralean fungi were isolated, their pathogenicity was determined by the Koch's postulates and fungal structures were registered. The molecular characterization was conducted by analyzing the ITS and 28S (LSU) ribosomal regions. The identification was confirmed by comparison with sequences deposited in the Genbank and by phylogenetic analysis. The strains isolated in this study were placed in monophyletic clades supporting to *Gilbertella persicaria* detected in the three states sampled, *Mucor irregularis* in Veracruz, and *Rhizopus oryzae* in Oaxaca as the

aislaron hongos mucorales, se determinó la patogenicidad con los postulados de Koch y se registraron datos de estructuras fúngicas. La caracterización molecular se realizó mediante análisis de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 28S (LSU) ribosomal. La identificación de las especies se confirmó por comparación con secuencias del Genbank y análisis filogenético. Las cepas aisladas en este estudio se ubicaron en clados monofiléticos soportando a las especies *Gilbertella persicaria* que se encontró en los tres estados muestreados, *Mucor irregularis* en Veracruz y *Rhizopus oryzae* en Oaxaca, como los agentes causales de pudrición blanda en papaya. Este es el primer reporte de *M. irregularis* y *R. oryzae* afectando frutos de papaya en México. Aunque *G. persicaria* ya se ha reportado causando enfermedad en Colima, aquí se demuestra su distribución en Oaxaca y Veracruz.

Palabras clave: *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis*, *Rhizopus oryzae*, esporangios.

INTRODUCCIÓN

México produce aproximadamente 764,514 t de papaya (*Carica papaya* L.) al año (FAO, 2014). Debido a su volumen de producción y generación de recursos, es importante en mercado nacional e internacional; sin embargo, los frutos de papaya muestran susceptibilidad a distintos microorganismos entre los que destacan los hongos, los cuales ocasionan pérdidas entre 10 al 50% debido a daños en la calidad (Morton, 1987; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). Dentro de los hongos mucorales reportados como fitopatógenos importantes se encuentran *Gilbertella persicaria*, *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp. (Hyde *et al.*, 2014), incluidos en las familias *Choanephoraceae*, *Mucoraceae* y *Rhizopodaceae*,

causal agents of papaya soft rot. This is the first report of *M. irregularis* and *R. oryzae* affecting papaya fruit in Mexico. Although *G. persicaria* has been reported in Colima State, this study shows its presence in Oaxaca and Veracruz States.

Key words: *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis*, *Rhizopus oryzae*, sporangia.

INTRODUCTION

Every year, Mexico produces approximately 764,514 t of papaya (*Carica papaya* L.) (FAO, 2014). Due to its production volume and creation of income, it is important in the national and international markets; however, papaya fruits are susceptible to different microorganisms, some of the most important of which are fungi, which cause losses of 10 up to 50% due to quality losses (Morton, 1987; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). Some of the mucoralean fungi reported as important plant pathogens include *Gilbertella persicaria*, *Mucor* spp., and *Rhizopus* spp. (Hyde *et al.*, 2014), included in the families *Choanephoraceae*, *Mucoraceae*, and *Rhizopodaceae*, respectively, which cause soft rot in fruits such as pears, apples, and peaches, and vegetables such as tomatoes. They spread quickly and have been widely reported in areas with tropical and subtropical climates (Michailides and Spotts, 1990).

Mucorales are mainly saprophytic fungi that live on the soil and decomposing plants. *Mucor* spp. are considered a polyphyletic group, and it is therefore necessary to carry out studies in several conserved regions of the genome for its correct identification (Hyde *et al.*, 2014; Walther *et al.*, 2013). *Gilbertella persicaria* is the only species in its genus (Benny, 1991; Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013) and it shows a high degree

respectivamente, los cuales ocasionan pudrición blanda de frutas como pera, manzana y durazno, y hortalizas como el tomate, son de rápida propagación y se han reportado ampliamente en zonas con climas tropicales y subtropicales (Michailides y Spotts, 1990).

Los mucorales son principalmente hongos saprofitos que habitan suelo y en plantas en descomposición. *Mucor* spp. se consideran un grupo polifilético, por lo que es necesario realizar estudios en múltiples regiones conservadas del genoma para su correcta identificación (Hyde *et al.*, 2014; Walther *et al.*, 2013). *Gilbertella persicaria* es la única especie de su género (Benny, 1991; Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013) y muestra un elevado grado de polimorfismo a nivel de morfología colonial y tasa de desarrollo micelial (Papp *et al.*, 2001). Dentro de *Rhizopus*, destacan las especies *R. oryzae* (syn. *R. arrhizus*) y *R. stolonifer* debido al gran número de casos reportados (Hyde *et al.*, 2014).

En México, los hongos mucorales ocasionan pudrición blanda de frutos de papaya en precosecha y poscosecha por lo que afectan el rendimiento y la calidad de los frutos en porcentajes aun no estimados. Recientemente, *G. persicaria* se reportó afectando frutos en el estado de Colima (Cruz-Lachica *et al.*, 2016); sin embargo, los estudios de identificación de estas especies son escasos y están basados en características morfológicas del microorganismo y en síntomas de la enfermedad (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013), lo cual en estas especies es altamente susceptible a errores (Ginting *et al.*, 1996). El objetivo de este estudio fue identificar las especies de hongos mucorales causantes de pudrición blanda en frutos de papaya mediante una identificación que incluyó caracterización morfológica y molecular.

of polymorphism in terms of colonial morphology and mycelial development rate (Papp *et al.*, 2001). Within *Rhizopus*, the species that stand out are *R. oryzae* (syn. *R. arrhizus*) and *R. stolonifer* due to the large number of cases reported (Hyde *et al.*, 2014).

In Mexico, mucoralean fungi cause soft rot in papaya fruits in preharvest and postharvest, and therefore affect fruit yield and quality in yet uncalculated percentages. Recently, *G. persicaria* was reported to be affecting fruits in the state of Colima (Cruz-Lachica *et al.*, 2016); however, the identification studies of these species are scarce and are based on the morphological characteristics of the microorganisms and in symptoms of the disease (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013), which, in these species, is highly susceptible to errors (Ginting *et al.*, 1996). The aim of this study was to identify the species of mucoralean fungi that cause soft rot in papaya fruits by an identification process that included morphological and molecular characterization.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

The collection of fruits with symptoms of soft rot (Figure 1A) was carried out based on its incidence on cv. Maradol papaya orchards during different sample collections in 2014: two in Tecmán, Colima in May and August in the orchard El Trébol (18° 53' 04.9" N, 103° 56' 33.7" O), one in October in Oaxaca in the town of San José Río Verde Jamiltepec (16° 08' 12" N, 97° 45' 11" O), and two more carried out in October in Veracruz, in the El Diamante orchard in Cotaxtla (18°52'25" N, 96° 12' 2" O) and in Tlaxicoyan (21° 50' 3" N, 96° 10' 35" O).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

La recolección de frutos con síntomas de pudrición blanda (Figura 1A) se realizó con base en su incidencia en huertos de papaya *cv.* Maradol, durante diferentes muestreos en 2014: dos en Tecmán, Colima durante mayo y agosto, en el huerto El Trébol (18° 53' 04.9" N, 103° 56' 33.7" O); uno realizado en octubre en Oaxaca en la localidad de San José Río Verde Jamiltepec (16° 08' 12" N, 97°

Isolation, purification, and conservation of mucoralean fungi

For each fruit with symptoms, the area with lesions was divided into quadrants and a section was taken from the edge, (approximately 0.5 cm of tissue from each section) and were washed with ethyl alcohol at 70% for 1 min, followed by a later wash with distilled water. They were then placed in plates with PDA (Potato Dextrose Agar, Bioxon) and incubated at 27 °C. They were purified by transferring hyphal tips onto new PDA

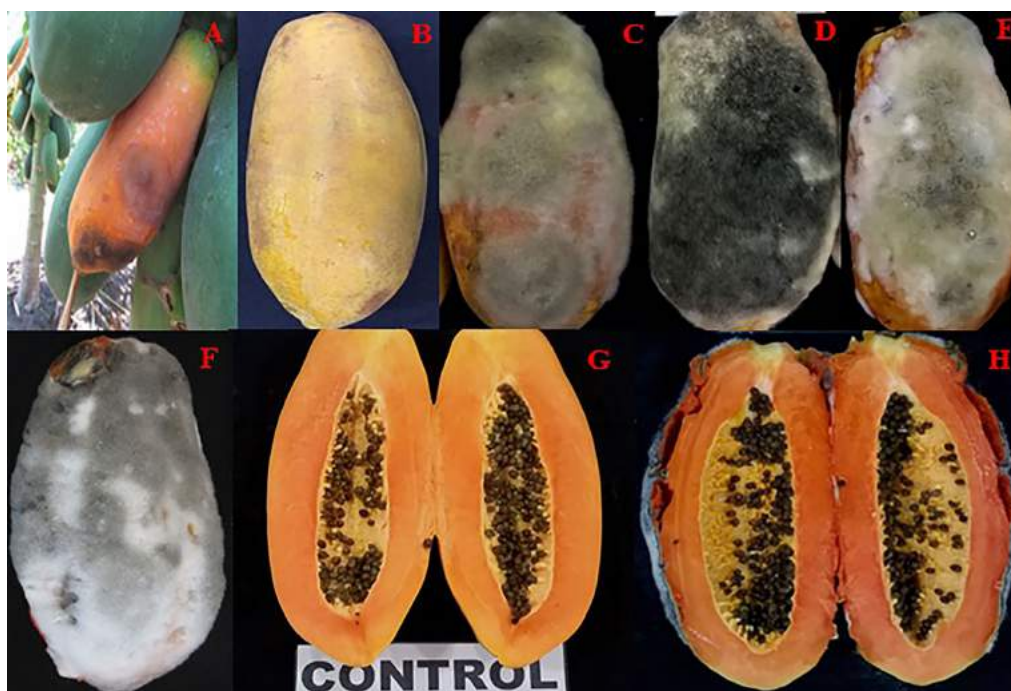


Figura 1. Patogenicidad de cepas de mucorales en frutos de papaya Maradol. (A) Fruto con signos y síntomas en campo (B y G) Fruto control asperjado con agua destilada estéril sin síntomas, (C) Fruto con esporangios color café oscuro de *Gilbertella persicaria* morfotipo 1, (D) Fruto con esporangios de color gris a negro de *Gilbertella persicaria* morfotipo 2, (E) Fruto con esporangios café claro de *Mucor irregularis*, (F) Fruto con esporangios gris a negro de *Rhizopus oryzae* y, (H) Corte longitudinal de un fruto con visible pudrición blanda interna y desprendimiento de tejidos por acción enzimática.

Figure 1. Pathogenicity of mucoralean strains in Maradol papaya fruits. (A) Fruit with signs and symptoms in field, (B and G) Control fruit sprayed with distilled water without symptoms, (C) Fruit with dark-brown colored morphotype 1 *Gilbertella persicaria* sporangia, (D) Fruit with gray to black-colored morphotype 2 *Gilbertella persicaria* sporangia, (E) Fruit with light brown-colored *Mucor irregularis* sporangia, (F) Fruit with gray to brown colored *Rhizopus oryzae* sporangia, and (H) Cross section of a fruit with visible internal soft rot and detachment of tissues due to enzymatic action.

45° 11' O), y dos más realizados durante octubre en Veracruz, en el huerto El Diamante en Cotaxtla (18° 52' 25" N, 96° 12' 2" O) y en Tlalixcoyan (21° 50' 3" N, 96° 10' 35" O).

Aislamiento, purificación y preservación de hongos mucorales

De cada fruto con síntomas, se dividió el área de las lesiones en cuadrantes y se tomó un trozo del borde de aproximadamente 0.5 cm de tejido por sección y se lavaron con alcohol etílico al 70% durante 1 min, con un lavado posterior con agua destilada; después, se sembraron en placas con PDA (Agar Papa Dextrosa, Bioxon) y se incubaron a 27 °C. La purificación se realizó por transferencia de puntas de hifas a nuevas placas de PDA y posteriormente se obtuvieron cultivos monospóricos (Chukwuka *et al.*, 2010; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). Los aislados se preservaron en tubos de vidrio con agua destilada estéril, para lo cual, se colocaron 20 discos de 6 mm de micelio en crecimiento activo en medio PDA de cultivos de 5 días de desarrollo, se selló la tapa con parafilm y se colocaron a 4 °C (Ryan *et al.*, 2012).

Prueba de patogenicidad

Los postulados de Koch para los aislados seleccionados se efectuaron en frutos sanos de papaya *cv.* Maradol en estado de madurez comercial; inicialmente, los frutos se desinfectaron con alcohol etílico al 70% y después se lavaron con agua destilada. Cada aislado se inoculó en 3 frutos, seleccionado tres sitios de inoculación por cada uno, en donde se realizaron heridas con una aguja estéril y se inocularon por aspersión con una suspensión de esporangiosporas a una concentración de 5×10^5 esporangiosporas/mL; adicionalmente, se incluyeron 3 frutos sanos sin heridas y asperjados con

plates and monosporic cultures were then obtained (Chukwuka *et al.*, 2010; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). The isolates were preserved in glass tubes with sterile distilled water, and for this 20 discs of 6 mm diameter of mycelium in active growth were placed in a PDA medium from 5-day old cultures. The lid was sealed with parafilm, and they were placed at 4 °C (Ryan *et al.*, 2012).

Pathogenicity test

Koch's postulates for selected isolates were carried out on healthy *cv.* Maradol papaya fruits in a commercially ripe state; initially, the fruits were disinfested with ethyl alcohol at 70% and then washed with distilled water. Each isolate was inoculated in 3 fruits, selecting three inoculation sites for each one, where incisions were made using a sterile needle and they were inoculated by spraying a sporangiospore solution at a concentration of 5×10^5 sporangiosporas/mL. In addition, 3 healthy fruits were included, all free of lesions and sprayed with the same sporangiospore solution and 3 control fruits, on which lesions were made and which were sprayed with sterile distilled water only. All fruits were placed in polyethylene bags (three fruits per bag), with paper towels dampened with sterile distilled water to produce a relative humidity of about 80%, and they were incubated at 25 °C for 5 days. Finally, the fungus was reisolated from the lesions and the morphological characteristics were confirmed with the fungus inoculated at the beginning of the experiment (Beales, 2012).

Morphological Characterization.

The macroscopic and microscopic cultural characteristics of the isolates grown in PDA were recorded. For this purpose, preparations were made and stained with lactophenol blue-cotton,

la misma concentración de esporangiosporas y 3 frutos control, los cuales fueron heridos y se asperjaron sólo con agua destilada estéril. Todos los frutos se colocaron dentro de bolsas de polietileno (tres frutos por bolsa), con toallas absorbentes humedecidas con agua destilada estéril para generar aproximadamente 80% de humedad relativa y se incubaron a 25 °C durante 5 días. Finalmente, el hongo se reisoló de las lesiones y las características morfológicas se confirmaron con el hongo inoculado al inicio del experimento (Beales, 2012).

Caracterización morfológica

Se registraron las características culturales macroscópicas y microscópicas de los aislados crecidos en PDA; para lo cual se realizaron preparaciones teñidas con azul de lactofenol-algodón y se observaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss Imager A2, Alemania). Los apéndices de esporangiosporas y espinas de esporangios se observaron en un microscopio de contraste de interferencia diferencial (Leica DMI 6000 B, Alemania) acoplado con una cámara (Leica DFC450C). Se registró la medida de 100 estructuras morfológicas, las cuales incluyeron: diámetro y patrón de ramificación de esporangióforo, tamaño y forma de esporangios y esporangiosporas, columela y clamidosporas, tamaño y presencia/ausencia de apéndices, así como el tipo de micelio (Campbell *et al.*, 2013).

Tasa de desarrollo micelial

En el centro de cajas petri de 90 mm de diámetro con medio PDA, se colocó un disco de 6 mm proveniente del margen de colonias fúngicas de los aislados crecidos durante 3 días en PDA, y se incubaron a 4, 10, 15, 25 y 40 °C. El diámetro de la colonia se registró diariamente hasta que cubrió la totalidad de la placa, posteriormente, se efectuó la

and observed under an optic microscope (Carl Zeiss Imager A2, Germany). The appendages of sporangiospores and sporangial spines were observed using a differential interference contrast microscope (Leica DMI 6000 B, Alemania) connected to a camera (Leica DFC450C). The measurement of 100 morphological structures was recorded, and included the diameter and branching pattern of sporangiophores, columellae and chlamydospores, size and presence/absence of appendages, as well as the type of mycelium (Campbell *et al.*, 2013).

Mycelial development rate

In the center of petri dishes, 90 mm in diameter and containing PDA, a 6 mm disc was placed, taken from the edge of fungal cultures of the isolates grown for 3 days in PDA, and they were incubated at 4, 10, 15, 25, and 40°C. The diameter of the culture was recorded on a daily basis until it covered the entire plate. Later, a relation was made between the diameter and the number of days of the test (Michailides, 1991).

Molecular Characterization

Extraction of DNA, amplification with PCR and sequencing. Each isolate's mycelium was produced in a PDA medium for two days at 27 °C; later, it was collected with a sterilized slide and the genomic DNA was extracted according to the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method, following the procedure described by Voigt *et al.* (1999) with slight modifications: briefly, 30 mg of mycelia were placed in 1.5 mL microcentrifuge tubes and 700 µL of CTAB buffer solution were added [100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 25 mM of EDTA, 2% CTAB], it was macerated and placed in a vortex for 10 s. Next, 700 µL of

relación del diámetro con el número de días de la prueba (Michailides, 1991).

Caracterización molecular

Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación. El micelio de cada aislado se produjo en medio PDA durante dos días a 27 °C; posteriormente, se colectó con un portaobjetos estéril y el ADN genómico se extrajo de acuerdo al método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) siguiendo el protocolo descrito por Voigt *et al.* (1999) con ligeras modificaciones: brevemente, se colocó 30 mg de micelio en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregó 700 µL de solución amortiguadora CTAB [100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 25 mM de EDTA, 2% CTAB], se maceró y se colocó en vórtex por 10 s; posteriormente, se agregó 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (Sigma-Aldrich) por tubo, se sometió a vórtex por 10 s y se centrifugó a 12,300 x g durante 10 min. Se recuperó una porción de 500 µL de la fase superior y se colocó en un nuevo tubo; se agregó una cantidad igual de isopropanol (Sigma-Aldrich) a -20 °C, y se mezcló suavemente; posteriormente, se centrifugó de nuevo a 12,300 x g durante 2 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 12,300 x g durante 2 min. Se descartó el etanol y se permitió su evaporación por completo. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 200 µL de solución amortiguadora Tris EDTA [10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)].

La amplificación se realizó de acuerdo con Walther *et al.* (2013), en el cual el ADN ribosomal, incluyendo la región completa ITS1-5.8S-ITS2 y la región D1/D2 de la subunidad 28S (LSU), se amplificaron con el par de oligonucleótidos V9G (5'-

choloform-isoamylic alcohol was added (24:1) (Sigma-Aldrich) per tube; it was vortexed for 10 s and centrifuged at 12,300 x g for 10 min. A 500 µL portion of the top section was recovered and placed in a new tube; the same amount of isopropanol (Sigma-Aldrich) was added at -20 °C, and mixed softly. Later, it was centrifuged again at 12,300 x g for 2 min and the supernatant was discarded. The DNA pellet was washed with 500 µL of ethanol at 70%, centrifuged at 12,300 x g for 2 min. The ethanol was discarded and allowed to evaporate completely. Finally, the pellet was resuspended in 200 µL of Tris EDTA buffer solution [10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)].

Amplification was carried out in accordance with Walther *et al.* (2013), where ribosomal DNA, including the complete region of ITS1-5.8S-ITS2 and the region D1/D2 of the subunit 28S (LSU) were amplified with the pair of oligonucleotides V9G (5'- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') (de Hoog y van den Ende, 1998), and LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3') (Vilgalys and Hester, 1990). The mixture of the PCR reaction (25 µl), included 20 ng of ADN, 0.4 µM of each oligonucleotide, 0.185 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 5X reaction buffer, 1.5 mM of MgCl₂ and 0.8 U of the enzyme Taq ADN polymerase using the kit GoTaq[®] PCR Core Systems (Promega, USA). The amplification reaction was carried out in a BioRad T100[™] (Singapore) thermocycler, with the following cycles: an initial step of denaturalization for 5 min at 94 °C, followed by 35 one minute cycles at 94 °C, 1 min at 53 °C, and 2 min at 72 °C, with a final extension of 7 min at 72 °C. To observe the bands of the amplified DNA products, the products were run in agarose gel at 0.8%, stained with ethidium bromide. The estimation of the molecular weights of the amplified products was carried out by comparison with a 1 Kb molecular

TTACGTCCCTGCCCTTTGTA- 3') (de Hoog y van den Ende, 1998) y LR3 (5'-GGTCCGTGTTT-CAAGAC- 3') (Vilgalys y Hester, 1990). La mezcla de reacción de PCR (25 µl), incluyó 20 ng de ADN, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 0.185 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 5X amortiguador de reacción, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.8 U de la enzima Taq ADN polimerasa utilizando el kit GoTaq[®] PCR Core Systems (Promega, USA). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador marca BioRad T100[™] (Singapur), con los siguientes ciclos: un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C y 2 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. Para visualizar las bandas de los productos de ADN amplificados, los productos se corrieron en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. La estimación de los pesos moleculares de los productos amplificados se realizó por comparación con un marcador molecular de 1 Kb (Promega, USA); posteriormente, la visualización de los productos amplificados se realizó en un fotodocumentador Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ (BioRad, USA).

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV unidad Irapuato, utilizando para la región ITS, los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(White *et al.*,1990), y para la región D1/D2 28S (LSU) los oligonucleótidos NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3') (O'Donnell, 1993) y LR3 (Vilgalys y Hester, 1990), el proceso de secuenciación se realizó para ambos sentidos del amplicón.

marker (Promega, USA). Afterwards, the amplified products were viewed using a Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ photodocumenter (BioRad, USA). PCR products were purified using the Wizard[®] SV Gel kit and the PCR Clean-Up System (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out in the National Genomics Laboratory for Biodiversity, CINVESTAV Irapuato, using oligonucleotides ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*,1990) for the ITS region, and for region D1/D2 28S (LSU), oligonucleotides NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3') (O'Donnell, 1993) and LR3 (Vilgalys and Hester, 1990); the sequencing process was carried out for both directions of the amplicon.

Phylogenetic analysis of the sequences.

The sequences were edited using the program Bioedit Sequence Alignment Editor, version 7.2.5. (Hall, 1999). The alignment was carried out using the program ClustalW, and the consensus sequences obtained were compared with the basic local alignment search tool BLASTN of the NCBI (National Center for Biotechnology Information). To perform the evolutionary analyses, the sequences obtained were saved in the FASTA format, and the alignment was carried out using the program ClustalW included in the software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood Method, based on the Tamura-Nei model (Tamura and Nei,1993). The graphic representation of the dendrogram based on region ITS and 28S (LSU) was carried out with the Neighbor-Joining method, with a bootstrap analysis of 1000 repetitions to determine the trust values for the clades (Felsenstein, 1985), using reference strains available from the GenBank of the NCBI.

Análisis filogenéticos de las secuencias

La edición de las secuencias se realizó con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor, versión 7.2.5. (Hall, 1999). El alineamiento se llevó a cabo con el programa ClustalW y las secuencias consenso obtenidas se compararon con la herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales BLASTN del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para realizar los análisis evolutivos, las secuencias obtenidas fueron guardadas en formato FASTA y el alineamiento se realizó con el programa ClustalW incluido en el software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). La historia evolutiva fue inferida usando el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Method), basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). La representación gráfica del dendrograma con base en la región ITS y 28S (LSU) se realizó por la aplicación del método Neighbour-Joining, con un análisis bootstrap de 1000 repeticiones para determinar los valores de confianza para los clados (Felsenstein, 1985), utilizando cepas de referencia disponibles en GenBank del NCBI.

RESULTADOS

De los 4 trozos sembrados por fruto enfermo, un 100% correspondió al hongo reportado para cada caso. Se obtuvieron 28 aislados asociados a pudrición blanda en frutos de papaya, 4 de Colima, 23 de Veracruz y 1 de Oaxaca. Todos los aislados se caracterizaron morfológicamente y se depositaron en el cepario de hongos del laboratorio de Fitopatología de CIAD. Los aislados de Colima, el de Oaxaca y 5 representativos de Veracruz se seleccionaron para evaluar patogenicidad y caracterizarlos molecularmente (Cuadro 1).

RESULTS

Out of the 4 pieces plated for every diseased fruit, 100% corresponded to the fungus reported for each case. Twenty eight isolates were obtained, related to soft rot in papaya fruits, 4 from Colima, 23 from Veracruz, and 1 from Oaxaca. All isolates were characterized morphologically and deposited in the fungal collection of the CIAD Plant Pathology Laboratory. The isolates from Colima, Oaxaca, and 5 representative from Veracruz were selected for the evaluation of pathogenicity and molecular characterization (Table 1).

Pathogenicity tests

All Maradol papaya fruits inoculated through lesions with the mucoralean species presented, 24 h after inoculation, symptoms that included humid-looking lesions of approximately 1 cm in diameter; white mycelia developed 48 h later, and after 72 h, sporangia were produced. Finally, 5 d after inoculation, the development of abundant light to dark brown mycelia and sporangia (Figures 1E and 1C), and gray to black (Figures 1D and 1F) was observed. By contrast, the fruits without lesions did not show symptoms of disease (Figures 1B and 1G). Internal damage in the infected fruit consisted of a soft rot that caused detachment of tissues (Figure 1H).

Morphological characteristics of *Mucor irregularis*

Cultures from isolation HP160, identified as *M. irregularis*, were circular, uniform, and with abundant, pale yellow aerial mycelia (Figure 2A), a color which was also observed on the reverse side of the plate (Figure 2B). The rate of mycelial growth was 1.48 cm/day at 25 °C; it did not develop

Cuadro 1. Especies de hongos mucorales causantes de pudrición blanda en frutos de papaya. Cada cepa (clave de cepario HP “Hongo Papaya”) corresponde al hongo obtenido de los 4 trozos de tejido sembrados en PDA por fruto enfermo.
Table 1. Species of mucoralean fungi causing soft rot in papaya fruits. Each strain (fungal collection code HP “Papaya Fungus”) corresponds to the fungus obtained from the 4 pieces of tissue plated in PDA per diseased fruit.

| Localidad | Entidad | Frutos | Colonias Mucorales | Especie | Aislamiento | Colonias de otros hongos |
|-------------------------------|----------|--------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------|
| El Trébol | Colima | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP09 ^x | - |
| El Trébol | Colima | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP15 ^x | - |
| El Trébol | Colima | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP19 ^x | - |
| El Trébol | Colima | 1 | 4/4 | <i>R. oryzae</i> | HP25 ^x | - |
| San José Río Verde Jamiltepec | Oaxaca | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP114 ^x | - |
| El Diamante Cotlaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>M. irregularis</i> | HP160 ^x | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP162 | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP165 | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP167 ^x | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP169 | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP170 | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP171 | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP172 | - |
| El Diamante Cotaxtla | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP173 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP178 ^x | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP179 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP182 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP183 ^x | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP192 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP197 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP199 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP210 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP211 ^x | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP226 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP231 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP235 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP236 | - |
| Tlalixcoyan | Veracruz | 1 | 4/4 | <i>G. persicaria</i> | HP240 | - |

^xaislados representativos utilizados en la caracterización molecular / ^xrepresentative isolates used in molecular characterization.

Pruebas de patogenicidad

Todos los frutos de papaya *cv.* Maradol inoculados a través de heridas con las especies de mucorales presentaron, a las 24 h después de la inoculación, el desarrollo de síntomas que incluían lesiones de apariencia húmeda de aproximadamente 1 cm de diámetro; posteriormente, se desarrolló micelio de color blanco a las 48 h, y a las 72 h

at 4 °C, but it did between 10 and 40 °C (Table 2). The sporangiophores, mostly not branched, presented globular sporangia on their tips, of less than 80 µm, and which contained hundreds of elliptical sporangiospores inside them (Figure 2E and 2C). The columella with an almost spherical hyaline appearance presented a collarete, remanent of the sporangial wall (Figure 2D).

se produjeron esporangios; finalmente, a los 5 d después de inoculación, se observó el desarrollo de abundante micelio y esporangios de color café claro a oscuro (Figura 1E y 1C) y de gris a negro (Figura 1D y 1F). En contraste, los frutos sin heridas y testigo con heridas no mostraron síntomas de enfermedad (Figura 1B y 1G). El daño interno en los frutos infectados consistió en una pudrición blanda que ocasionó desprendimiento de tejidos (Figura 1H).

Características Morfológicas de *Mucor irregularis*.

Las colonias del aislamiento HP160, identificado como *M. irregularis*, fueron circulares, uniformes y con abundante micelio aéreo de color amarillo pálido (Figura 2A); color que de igual manera

Morphological characteristics of *Gilbertella persicaria*

G. persicaria displayed two types of cultural morphology (Figures 3A and 3E). In the first one, the culture is petaloid with yellow to brown sporangia (Figure 3C), and with a mycelial growth of 1.48 cm/day at 25 °C (strains HP09 and HP114), whereas the second type presents circular cultures, with a more dense mycelia and gray to black sporangia (Figures 3G and 3H), with a mycelial growth rate of 2.46 cm/día (HP15, HP19, HP167, HP178, HP183 and HP211). None of the strains grew at 4 °C, although they did show development between 10 and 40 °C. Other characteristics in *G. persicaria* include the release of sporangiospores by the breaking of the sporangial wall in two

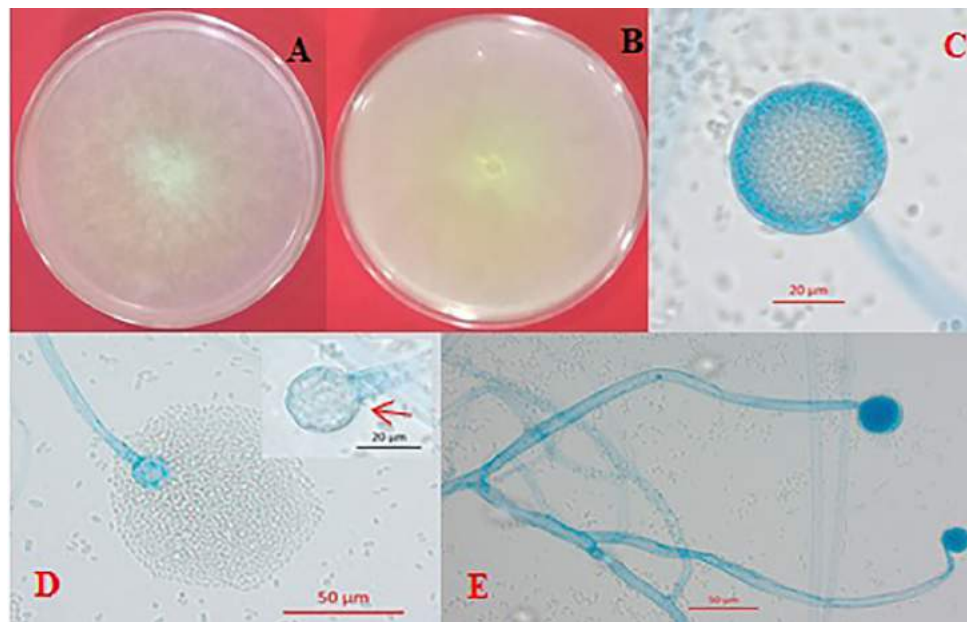


Figura 2. Características morfológicas de *Mucor irregularis*. (A) Desarrollo micelial circular de color amarillo pálido y abundante micelio aéreo, (B) Placa invertida mostrando una coloración amarillo claro, (C) Esporangio globoso con esporangiosporas, (D) Liberación de esporangiosporas y presencia de columella con forma casi esférica y collarete característico y, (E) Esporangióforos hialinos no ramificados.

Figure 2. Morphological characteristics of *Mucor irregularis*. (A) Circular, pale yellow mycelial growth and abundant aerial mycelia, (B) Inverted plate showing a light-yellow color, (C) Globose sporangium with sporangiospores, (D) Release of sporangiospores and presence of columella with an almost spherical shape and a distinctive collarette, and (E) Non-branched hyalin sporangiophores.

se observó al reverso de la placa (Figura 2B). La tasa de desarrollo micelial fue de 1.48 cm/día a 25 °C, no se desarrolló a 4 °C, pero sí entre 10 y 40 °C (Cuadro 2). Los esporangióforos, en su mayoría no ramificados, presentaron en la punta esporangios globosos, menores a 80 µm, que contenían en su interior cientos de esporangiosporas elípticas (Figura 2E y 2C). La columela de apariencia hialina casi esférica presentó un collarite remanente de la pared esporangial (Figura 2D).

Características morfológicas de *Gilbertella persicaria*

G. persicaria mostró dos tipos de morfología colonial (Figura 3A y 3E). En el primer tipo, la colonia es petalada con esporangios amarillo a café

halves (Figure 3I), the presence of small hyalin spines in the walls of the sporangia (Figure 3K), and the presence of hyaline appendages in the sporangiospores (Figure 3J). In the microscopic structures of both types of cultures, no relevant morphological differences were observed (Table 2). The sporangiophores are scarcely branched (four to six in every 100 analyzed); the ovoidal columella with a residual collarite, and cylindrical chlamydo spores (Figure 3D), abundant in PDA in 5-day-old cultures.

Morphological characteristics of *Rhizopus oryzae* (syn. *R. arrhizus*)

Cultures of strain HP25 identified as *Rhizopus oryzae* showed an abundance of initially white aerial

Cuadro 2. Características morfológicas de especies de mucorales aislados de frutos de papaya con pudrición blanda. Las medidas mostradas se realizaron a partir de cultivos en PDA e incubados a 27 °C.

Table 2. Morphological characteristics of mucoralean species isolated from papaya fruits with soft rot. The measurements shown were carried out from cultures in PDA and incubated at 27 °C.

| Característica | <i>Gilbertella persicaria</i>
Morfortipo 1 | <i>G. persicaria</i>
Morfortipo 2 | <i>Mucor irregularis</i> | <i>Rhizopus oryzae</i> |
|---|--|---|--|---|
| Morfología Colonial | Petalada | Circular | Circular | Circular |
| Tasa de desarrollo micelial | 1.48 cm/día | 2.46 cm/día | 1.48 cm/día | 2.46 cm/día |
| Color de esporangios | Amarillo-café | Gris-negro | Café claro | Café-oscuro a negro |
| Esporangio ^x | 84.62 µm (64.77-139.7) | 88.20 µm (49.91-169.49) | 49.3 µm (24.95-72.02) | 112.5µm (48.17-198.67) |
| Columela ^x | 50.964 µm (36.86-84.39) x
42.58 µm (35.6-78.56) | 65.27 µm (18.4-97.96) x
42.66 µm (14.75-79.13) | 24.7 µm (10.53-47.99) x
23.35 µm (8.63-44.02) | 68.91µm (137.02-33.41) x
67.62µm (112.72-25.7) |
| Clamidospora ^x | 35.72 µm (15.58-37.55) x
22.42 µm (11.64-29.84) | 35.37 µm (19.13-69.87) x
19.65 µm (11.38-27.8) | No se observó | No se observó |
| Esporangiospora ^x | 8.53 µm (5.54-10.99) x
6.72 µm (4.43-9.06) | 7.69 µm (6.05-11.007) x
6.43 µm (4.59-9.22) | 4.77 µm (3.12-8.7) x
2.77 µm (1.79-4.68) | 7.99µm (5.52-11.31)
x 6.17µm (4.52-7.66) |
| Diámetro de esporangióforo ^x | 24.12 µm (12.33-32.47) | 20.03 µm (9.18-28.93) | 11.47 µm (4.99-17.09) | 10.13µm (6.38-17.77) |
| Temperaturas cardinales | 10, 25 y 40 °C | 10, 25 y 40 °C | 10, 25 y 40 °C | 15, 25 y 40 °C |
| Patrón de ramificación | Escasamente ramificado (4) | Escasamente ramificado (6) | Escasamente ramificado (4) | No ramificado |

^xValores promedio y rangos en paréntesis (n=100) / ^xAverage values and ranges in parentheses (n=100).

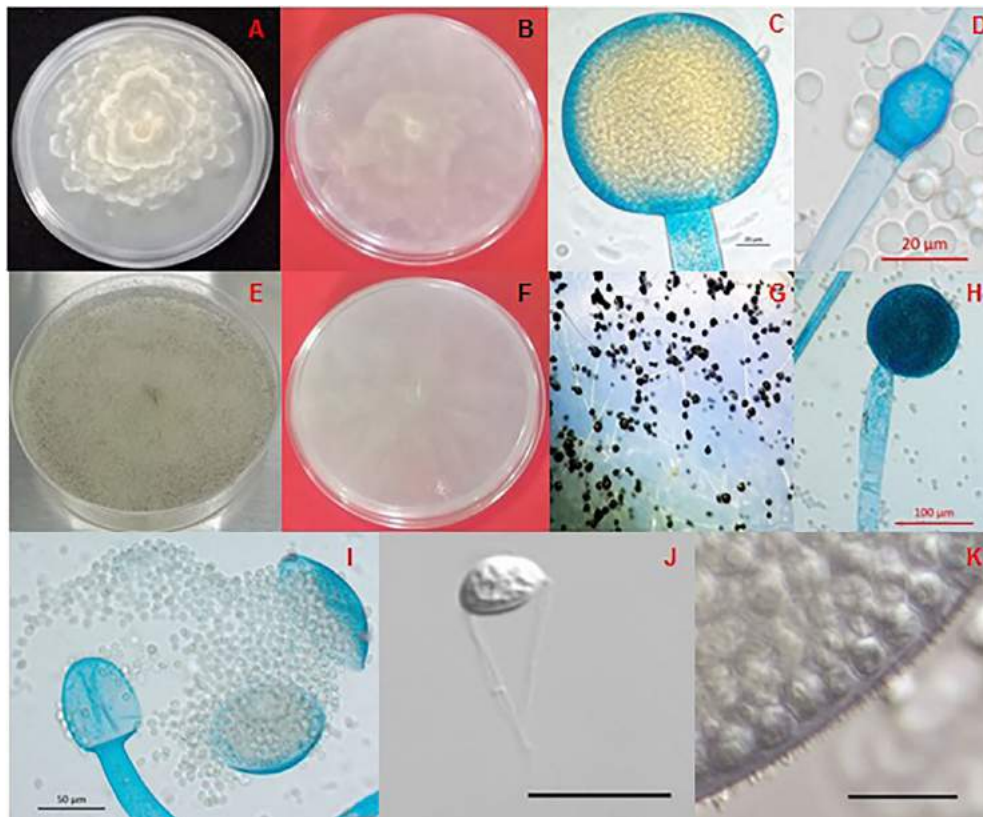


Figura 3. Características morfológicas de *Gilbertella persicaria*. (A) Colonia en PDA con desarrollo micelial irregular en colonias petaladas, (B) Reverso del cultivo, (C) Esporangio globoso multiesporado de color amarillo-café, (D) Clamidospora cilíndrica, (E) Cultivo en PDA con desarrollo micelial circular, (F) Reverso del cultivo, (G) Esporangios negros, (H) Esporangio maduro globoso multiesporado de color oscuro, (I) Apertura de la pared esporangial en dos mitades mostrando la columela ovoide, (J) Esporangiospora con apéndices hialinos polares, (K) Pared esporangial cubierta de pequeñas espinas hialinas. Figuras (J y K) barra=20 µm.

Figure 3. Morphological characteristics of *Gilbertella persicaria*. (A) Culture in PDA with irregular mycelial growth in petaloid colonies, (B) Reverse side of the culture, (C) Yellowish-brown, multisporous globose sporangium, (D) Cylindrical chlamyospore, (E) Culture in PDA with a circular mycelial growth, (F) Reverse side of the culture, (G) Black sporangia, (H) Dark mature multisporous globose sporangium, (I) Opening of the sporangial wall in two halves, showing the ovoidal columella, (J) Sporangiospore with polar hyalin appendages, (K) Sporangial wall covered with small hyalin spines. Figures (J and K) bar=20 µm.

(Figura 3C) y con un desarrollo micelial de 1.48 cm/día a 25 °C (cepas HP09 y HP114); mientras que, el segundo tipo presenta colonias circulares, con micelio más denso y coloración de esporangios de gris a negro (Figura 3G y 3H), con una tasa de desarrollo micelial de 2.46 cm/día (HP15, HP19, HP167, HP178, HP183 y HP211). Ninguna de las cepas se desarrollaron a 4 °C, pero si mostraron desarrollo

mycelia that later turned grayish (Figure 4A and 4B), dark brown to black sporangia that contained sporangiospores with a striated appearance (Figure 4C and 4E). Upon the release of sporangiospores, the light brown globular columella was observed (Figure 4D). The sporangiophores emerge from basal rhizoids (Figure 4F). *R. oryzae* presented a mycelial growth of 2.46 cm/day at 25 °C; it did not

entre 10 a 40 °C. Otras características en *G. persicaria* incluyen la liberación de esporangiosporas por medio de la ruptura de la pared esporangial en dos mitades (Figura 3I), la presencia de pequeñas espinas hialinas en la pared de los esporangios (Figura 3K) y la presencia de apéndices hialinos en las esporangiosporas (Figura 3J). En las estructuras microscópicas de los dos tipos de colonias, no se observaron diferencias morfológicas relevantes (Cuadro 2). Los esporangióforos son escasamente ramificados (de cuatro a seis por cada 100 analizados), la columela ovoide con un collarete residual y, clamidosporas cilíndricas (Figura 3D) abundantes en PDA en cultivos de 5 días.

Características morfológicas de *Rhizopus oryzae* (syn. *R. arrhizus*)

Las colonias de la cepa HP25 identificada como *Rhizopus oryzae* mostró abundante micelio aéreo de color blanco en un inicio y posteriormente grisáceo (Figura 4A y 4B), esporangios de color café oscuro a negro que contenían esporangiosporas de apariencia estriada (Figura 4C y 4E). Al liberarse las esporangiosporas se observó la columela globosa de color café claro (Figura 4D). Los esporangióforos emergen a partir de rizoides basales (Figura 4F). *R. oryzae* mostró desarrollo micelial de 2.46 cm/día a 25 °C, no se desarrolló a 4 °C, pero sí entre 15 y 40 °C (Cuadro 2).

Identificación molecular

La reacción de amplificación con los oligonucleótidos V9G y LR3, generó un fragmento aproximado de 1500 pb, que incluyó la región completa ITS1-5.8S-ITS2 y la región D1/D2 de la subunidad 28S (LSU) ribosomal. Las secuencias consenso obtenidas variaron para la región ITS1-5.8S-ITS2 de 543 a 751 pb y para la región parcial de la subunidad 28S (LSU) ribosomal de 632 a 711 pb.

grow at 4°C, but it did between 15 and 40°C (Table 2).

Molecular identification

The reaction of amplification with the oligonucleotides V9G and LR3 generated an approximate fragment of 1500 pb, which included the complete region of ITS1-5.8S-ITS2 and the region D1/D2 of the ribosomal subunit 28S (LSU). The consensus sequences obtained varied for the region ITS1-5.8S-ITS2 from 543 to 751 pb and for the partial region of ribosomal subunit 28S (LSU) from 632 to 711 pb.

The comparison in the data base showed, for the sequencing of the strain HP160 (Access N° KR076763 and KR076764), a percentage of identity of 99% and 96% for the region ITS with strains identified as *Mucor sp.* (Access N° HM770967 and KP714393, respectively), showing an identity of 91% with the strain of *M. irregularis* (Access N° JX976251) (Figure 5). However, for the partial ribosomal region 28S (LSU), it showed an identity of 99% with different strains of *M. irregularis*, which show an alignment of 100% (Figure 6).

The comparison of the sequences of the region ITS1-5.8S-ITS2 of the strains HP09, HP15, HP19, HP114, HP167, HP178, HP183, and HP211 showed an identity of 100% with sequences deposited in the NCBI (Access N° JN206224 y KC683539) of the species *G. persicaria*, where we can observe in the phylogenetic analysis the formation of two groups that correspond to the two morphotypes found (Figure 5). The confirmation of this species was carried out by analyzing the sequences of the partial ribosomal region 28S (LSU) (Table 1), which also showed an identity of 100% with the strains (Access N° JN206517 and JN939197) of *G. persicaria*. Finally, the comparison of the sequence of the strain HP25 of the region ITS1-5.8S-ITS2 and partial region 28S (LSU) (Access N° KT899481

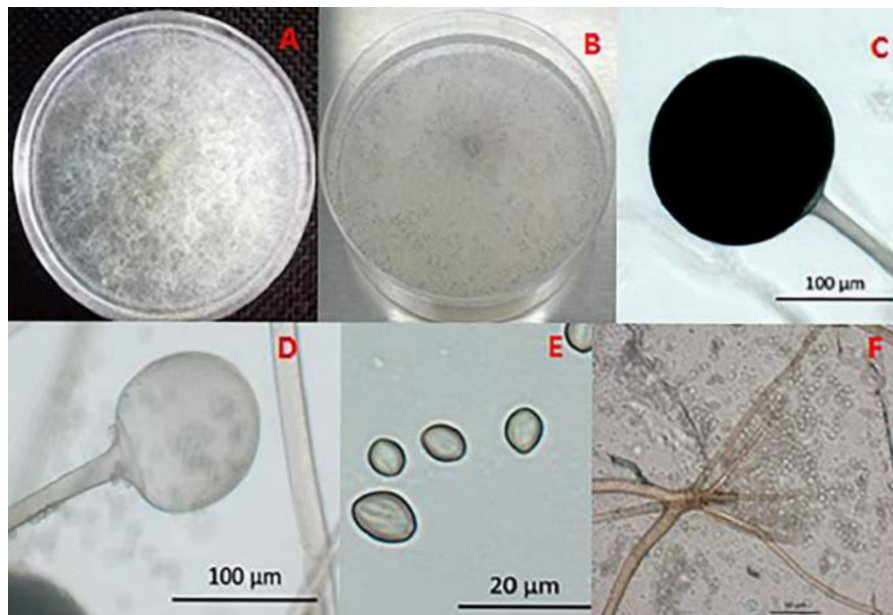


Figura 4. Características morfológicas de *Rhizopus oryzae*. (A) Colonia en PDA con abundante micelio algodonoso, (B) Colonia con esporangios negros, (C) Esporangio globoso multiesporado de color negro, (D) Columela de subglobosa a globosa, (E) Esporangiosporas de apariencia estriada y (F) Rizoide basal.

Figure 4. Morphological characteristics of *Rhizopus oryzae*. (A) Culture in PDA with abundant cotton-like mycelia, (B) Culture with black sporangia, (C) Black multispored globose sporangium, (D) Subglobose to globose columella, (E) Sporangiospores with a striated appearance, and (F) Basal rhizoid.

La comparación en la base de datos mostró para la secuencia de la cepa HP160 (N° Accesos KR076763 y KR076764), un porcentaje de identidad de 99% y 96% para la región ITS con cepas identificadas como *Mucor sp.* (N° Acceso HM770967 y KP714393, respectivamente); mostrando 91% de identidad con la cepa de *M. irregularis* (N° Acceso JX976251) (Figura 5); sin embargo, para la región parcial 28S (LSU) ribosomal mostró un 99% de identidad con diferentes cepas de *M. irregularis*, las cuales muestran un alineamiento en un 100% (Figura 6).

La comparación de las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las cepas HP09, HP15, HP19, HP114, HP167, HP178, HP183 y HP211, mostraron 100% de identidad con secuencias depositadas en el NCBI (N° de Acceso JN206224 y KC683539)

and KT899482) showed an identity of 100% with sequences published in the NCBI (Access N° KJ417552 and AY213624), respectively, of the species *R. oryzae* (Figure 5). The coverage of the consultations of all the consensus sequences in the NCBI data base varied between 91 and 100%.

DISCUSSION

In Mexico, the identification of plant pathogenic mucoralean species is scarce. The results of this study, focused on using morphological and molecular techniques to identify fungi, showed the presence of three species of mucorales related to the soft rot of papaya fruits. The symptoms produced in papaya fruits were similar to those reported

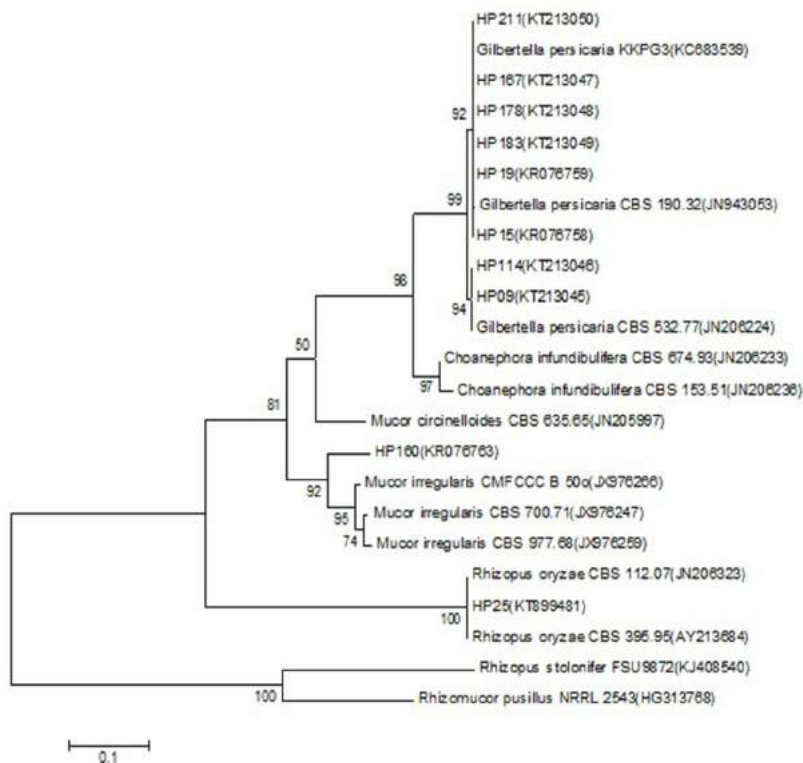


Figura 5. Dendrograma basado en el método de máxima verosimilitud a partir de secuencias obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2 de aislados de especies de Mucorales y de cepas de referencia de NCBI, los N° de acceso se encuentran entre paréntesis. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado. *Rhizomucor pusillos* se utilizó como outgroup. La escala representa el número de sustituciones por sitio.

Figure 5. Dendrogram based on the method of highest verosimilitude from sequences obtained for the region ITS1-5.8S-ITS2 of isolations of species of Mucorales and NCBI reference strains; the Access N° are in parentheses. The probability values of the nodes for each clade indicate the percentage of the replications of the analysis of 1000 bootstraps that support that clade. *Rhizomucor pusillus* was used as an outgroup. The scale represents the number of substitutions per site.

de la especie *G. persicaria*, donde se observa en el análisis filogenético la formación de dos grupos que corresponden a los dos morfotipos encontrados (Figura 5). La confirmación de esta especie se realizó con el análisis de las secuencias de la región parcial 28S (LSU) ribosomal (Cuadro 1), que de igual manera mostró 100% de identidad con las cepas (N° Acceso JN206517 y JN939197) de *G. persica-*

for peach, pear, and apple fruits (Michailides and Spotts, 1990), with initially soft lesions with an aqueous appearance, and that in a brief period of time become covered with mycelial masses. The symptom of soft rot observed in fruits is mainly due to the production of enzymes such as amylases, lipases, polygalacturonases, and proteases, which contribute in the degradation of structural and

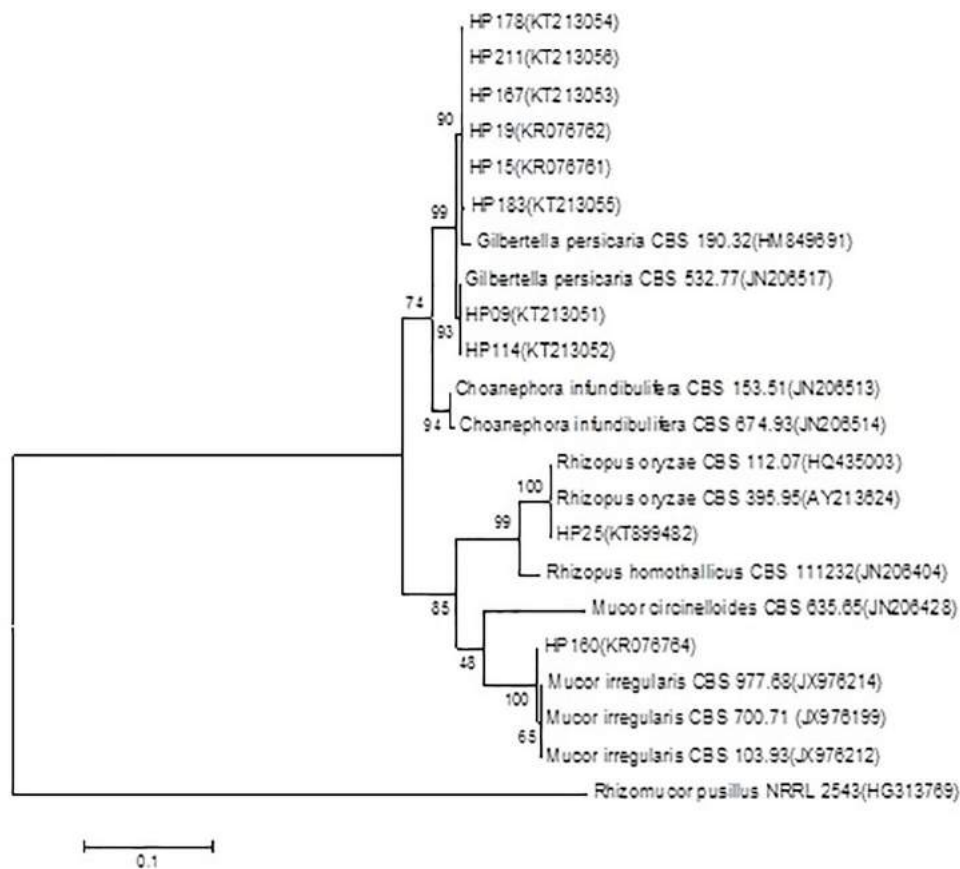


Figura 6. Dendrograma basado en el método de máxima verosimilitud a partir de la región 28S (LSU) para la cepa HP160 y cepas de referencia de NCBI, los N° de acceso se encuentran entre paréntesis. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado. *Rhizomucor pusillos* se utilizó como outgroup. La escala representa el número de sustituciones por sitio.

Figure 6. Dendrogram based on the method of highest verosimilitud from the region 28S (LSU) for the strain HP160 and NCBI reference strains; the Access N° are in parentheses. The probability values of the nodes for each clade indicate the percentage of the replications of the analysis of 1000 bootstraps that support that clade. *Rhizomucor pusillus* was used as an outgroup. The scale represents the number of substitutions per site.

ria. Finalmente, la comparación de la secuencia de la cepa HP25 de la región ITS1-5.8S-ITS2 y parcial 28S (LSU) (N° de Acceso KT899481 y KT899482) mostró 100% de identidad con secuencias publicadas en el NCBI (N° de Acceso KJ417552 y AY213624), respectivamente, de la especie *R. oryzae* (Figura 5). La cobertura de las consultas de todas las secuencias consenso en la base de datos de NCBI varió de 91 a 100%.

storage polysaccharides (Alves *et al.*, 2002; Krisch *et al.*, 2010).

The morphological characteristics of *M. irregularis* correspond with descriptions by different authors (Walther *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015). It is important to mention that, considering that the genus *Mucor* is polyphyletic, the ITS region was insufficient to discriminate between widely related species, therefore the species was

DISCUSIÓN

En México, la identificación de especies de mucorales fitopatógenos es escasa. Los resultados de este estudio enfocado en utilizar técnicas morfológicas y moleculares para identificación de hongos evidenció la presencia de tres especies de mucorales asociados a pudrición blanda de frutos de papaya. Los síntomas causados en frutos de papaya fueron similares a los reportados en frutos de durazno, pera y manzana (Michailides y Spotts, 1990), con lesiones iniciales suaves y de apariencia acuosa, y que en un corto periodo de tiempo se cubren de masas de micelio. El síntoma de pudrición blanda observada en frutos se debe principalmente, a la producción de enzimas como amilasas, lipasas, poligalacturonasas y proteasas, las cuales contribuyen en la degradación de los polisacáridos estructurales y de almacenamiento (Alves *et al.*, 2002; Krisch *et al.*, 2010).

Las características morfológicas de *M. irregularis* concuerdan con lo descrito por diversos autores (Walther *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015). Es necesario mencionar que, considerando que el género *Mucor* es polifilético, la región ITS fue insuficiente para discriminar entre especies estrechamente relacionadas, por lo que la confirmación de especie se realizó con el análisis filogenético de la región 28S (LSU) (Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013; Hyde *et al.*, 2014). *M. irregularis* recientemente fue reportado como fitopatógeno en maíz (Peng *et al.*, 2015). Éste se considera un primer reporte de *M. irregularis* afectando papaya.

La morfología de las estructuras de *G. persicaria* es similar a la reportada por diversos autores (Benny, 1991; Guo *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014); es considerada una especie monotípica en su género, el cual se ubica en la subfamilia *Gilbertelloideae* y familia *Choanephoraceae* (Hyde *et al.*, 2014). En este estudio se observó el desarrollo de

confirmado con el análisis filogenético de la región 28S (LSU) (Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013; Hyde *et al.*, 2014). *M. irregularis* fue recientemente reportado como patógeno en maíz (Peng *et al.*, 2015). Este es considerado un primer reporte de *M. irregularis* afectando papaya.

La morfología de *G. persicaria* es similar a la reportada por diversos autores (Benny, 1991; Guo *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014). Es considerada una especie monotípica en su género, la cual se ubica en la subfamilia *Gilbertelloideae* y familia *Choanephoraceae* (Hyde *et al.*, 2014). Este estudio observó el desarrollo de dos morfotipos, los cuales han sido definidos por Lacap *et al.* (2003) como cepas de la misma especie que muestran diferencias en morfología de cultivo y tasa de crecimiento micelial, lo cual fue confirmado con la separación en clados en el dendrograma de ambas regiones ITS y 28S (Figuras 5 y 6). Morfotipo 1 (colonias petaloideas, esporangios marrones) fue observado en el 31% de los aislamientos, mientras que el resto de los aislamientos presentó morfotipo 2 (69%). *G. persicaria* es un patógeno común en regiones tropicales y subtropicales, causando la pudrición blanda de tomate, pera, manzana, pitahaya, jambolán (Ginting *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014) y recientemente, se reportó que infectó frutos de papaya en el estado de Colima, México (Cruz-Lachica *et al.*, 2016). Este estudio reporta la presencia de esta especie en los estados de Oaxaca y Veracruz, mostrando que está presente en otras regiones productoras de papaya y su distribución debe ser considerada importante.

Las características morfológicas de *R. oryzae* concuerdan con las reportadas por diversos autores, y su identidad fue confirmada por análisis filogenético. *R. oryzae* ha sido reportado como causante de pudrición blanda en banana y cítricos (Kwon *et al.*, 2012; Hakim *et al.*, 2015), y por lo tanto este trabajo es el primer reporte de *R. oryzae* afectando papaya en México.

dos morfotipos, los cuales se han definido por Lacap et al. (2003) como cepas de una misma especie que presentan diferencias en morfología colonial y tasa de desarrollo micelial, lo cual se corroboró con la separación en clados dentro de los dendogramas tanto de la región ITS como 28S (Figuras 5 y 6). El morfotipo 1 (colonias petaladas, esporangios café) se observó en el 31% de los aislamientos; mientras que el resto de aislamientos mostró el morfotipo 2 (69%). *G. persicaria* es un patógeno común en regiones tropicales y subtropicales causando la pudrición blanda de tomate, pera, durazno, pitahaya, jambolán (Ginting et al., 1996; Guo et al., 2012; Pinho et al., 2014) y recientemente, se reportó causando enfermedad en frutos de papaya en el estado de Colima, México (Cruz-Lachica et al., 2016); en este estudio se reporta la presencia de esta especie en los estados de Oaxaca y Veracruz con lo que se demuestra que está presente en otras regiones de producción de papaya y debería considerarse su distribución como un factor de importancia.

Las características morfológicas de *R. oryzae*, concuerdan con las reportadas por diversos autores y su identidad se confirmó mediante el análisis filogenético. *R. oryzae* se ha reportado causando pudrición blanda en banana y cidra (Kwon et al., 2012; Hakim et al., 2015), por lo que se considera a este trabajo como el primer reporte afectando papaya en México.

De acuerdo con el origen de las muestras analizadas, *M. irregularis* fue detectado en el estado de Veracruz, *R. oryzae* en el estado de Colima y *G. persicaria* en Colima, Oaxaca y Veracruz. En México, *Mucor hiemalis* y *M. circinelloides* se han descrito afectando papaya en Veracruz (Suárez-Quiroz et al., 2013); sin embargo, la identificación de especies en ese estudio sólo involucró características morfológicas, por lo que se recomienda realizar análisis moleculares debido a lo siguiente:

According to the origin of the samples analyzed, *M. irregularis* was found in the state of Veracruz, *R. oryzae* in the state of Colima, and *G. persicaria* in Colima, Oaxaca, and Veracruz. In Mexico, *Mucor hiemalis* and *M. circinelloides* have been described as affecting papaya in Veracruz (Suárez-Quiroz et al., 2013). However, the identification of species in this study only involved morphological characteristics, therefore performing molecular analyses is recommendable for the following reasons: *M. hiemalis* and *M. irregularis* are found in a group of widely related species that require the use of molecular analyses in at least two regions of the genome for their identification (Walther et al., 2013). In the case of *M. circinelloides*, the identification based on symptoms in fruit and characteristics of sporangia corresponds with results obtained for *G. persicaria*, therefore distinctive characteristics of the latter species such as the opening of the sporangial wall in two halves and hyalin appendages in sporangiospores can go unnoticed.

CONCLUSIONS

This study showed that *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis*, and *Rhizopus oryzae* are causal agents of soft rot in papaya fruits. This is the first report on *Mucor irregularis* and *Rhizopus oryzae* affecting this crop in Mexico, and it shows that *G. persicaria* affects fruits in orchards in all three states. Finally, this study shows that the phenotypic and genotypic characterization is, in combination, an adequate strategy to identify species, particularly those that belong to widely related taxons. The access numbers for *M. irregularis* and *R. oryzae* in the NCBI genbank were KR076763 and KR076764, and KT899481 and KT899482, respectively.

M. hiemalis y *M. irregularis* se encuentran en un grupo de especies estrechamente relacionadas que requieren del uso de análisis moleculares en al menos dos regiones del genoma para su identificación (Walther *et al.*, 2013); en el caso de *M. circinelloides*, la identificación en base a síntomas en fruto y características de esporangios concuerda con lo obtenido para *G. persicaria*, por lo que características distintivas de esta última especie como apertura de pared esporangial en dos mitades y apéndices hialinos en esporangiosporas pueden pasar desapercibidas.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis* y *Rhizopus oryzae* son agentes causales de pudrición blanda en frutos de papaya. Éste es el primer reporte de *Mucor irregularis* y de *Rhizopus oryzae* afectando este cultivo en México y además demuestra que *G. persicaria* se encuentra afectando frutos en huertos de los tres estados. Finalmente, este estudio evidencia que la caracterización fenotípica y genotípica en conjunto es una estrategia adecuada para identificar especies, en particular las que pertenecen a taxones estrechamente relacionados. Los números de acceso de *M. irregularis* y *R. oryzae* en el genbank NCBI fueron KR076763 y KR076764, y KT899481 y KT899482, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” de SAGARPA por el financiamiento para esta investigación. A CONACyT por el apoyo financiero a los estudios de I. Cruz-Lachica.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the project 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” (The comprehensive management of papaya crops in Mexico, an innovative approach) by SAGARPA for the funding for this research. To CONACyT for the financial support of I. Cruz-Lachica’s studies.

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

## LITERATURA CITADA

- Alves MH, Campos-Takaki GM, Figueiredo PAL and Milanez AI. 2002. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. Brazilian Journal of Microbiology 33:325-330. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000400009>.
- Beales P. 2012. Detection of fungal plant pathogens from plants, soil, water and air. Pp: 26-52. In: Lane RC, Bealesand PA and Hughes JDK (eds.). Fungal Plant Pathogens. CAB International. U. K. 324 p.
- Benny L. 1991. *Gilbertellaceae*, a new family of the *Mucorales* (Zygomycetes). Mycologia 83:150-157. <http://dx.doi.org/10.2307/3759930>.
- Campbell CK, Johnson EM and Warnack DW. 2013. Identification of Pathogenic Fungi. Second Edition. Wiley-Blackwell. Health Protection Agency. U.K. 337 p.
- Chukwuka KS, Okonko IO and Adekunle AA. 2010. Microbial ecology of organisms causing pawpaw (*Carica papaya* L.) fruit decay in Oyo State, Nigeria. American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences 2:43-50. [http://www.idosi.org/aejts/2\(1\)10/7.pdf](http://www.idosi.org/aejts/2(1)10/7.pdf).
- Cruz-Lachica I, Marquez-Zequera I, Garcia-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, Leon-Felix J and Allende-Molar R. 2016. First report of *Gilbertella persicaria* causing papaya fruit rot. Plant Disease 100:227. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0607-PDN>.
- de Hoog GS and van den Ende GAH. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. Mycoses 41:183-189. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00321.x>.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791. <http://dx.doi.org/10.2307/2408678>.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2014. Estadísticas. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consulta (Julio, 2016).
- Ginting C, Zehr EI and Westcott SW. 1996. Inoculum source and characterization of isolates of *Gilbertella persicaria* from peach fruit in South Carolina. Plant Disease 80:1129-

1134. [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Articles/PlantDisease80n10\\_1129.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Articles/PlantDisease80n10_1129.pdf).
- Guo LW, Wu XY, Mao ZC, Ho HH and He YQ. 2012. Storage rot of dragon fruit caused by *Gilbertella persicaria*. *Plant Disease* 96(12):1826. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0635-PDN>.
- Hakim S, Naz S, Gul S, Chaudhary HJ and Munis MFH. 2015. First report of *Rhizopus oryzae* causing fruit rot of *Citrus medica* L. in Pakistan. *Journal of Plant Pathology* 97:209-220. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I1.035>.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic acids. Symposium Series. Oxford University Press* 41:95-98. <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>.
- Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, Hoog GS, Benny GL, Kirk PM and Voigt K. 2013. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia* 30:57-76. <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X666259>.
- Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE *et al.* 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity* 67:21-125. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>.
- Krisch J, Takó M, Papp T and Vágvölgyi C. 2010. Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from Zygomycetes. Pp: 891-895. *In: Méndez-Vilas A (ed.). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Vol. II. Formatex Research Center. Extremadura, Spain. 1620 p.*
- Kwon J, Ryu J, Chi TTP, Shen S and Choi O. 2012. Soft rot of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of banana fruit in Korea. *Mycobiology* 40:214-216. <http://dx.doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.2.140>.
- Lacap DC, Hyde KD and Liew ECY. 2003. An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity* 12: 53-66. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD12-53-66.pdf>
- Michailides TJ. 1991. Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from stone fruits from California and Chile. *Plant Disease* 75:373-380. [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n04\\_373.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n04_373.pdf).
- Michailides TJ and Spotts RA. 1990. Postharvest diseases of pome and stone fruits caused by *Mucor piriformis* in the Pacific Northwest and California. *Plant Disease* 74:537-543. [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1990Articles/PlantDisease74n08\\_537.PDF](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1990Articles/PlantDisease74n08_537.PDF).
- Morton J. 1987. Papaya (*Carica papaya* L.). Pp: 336-346. *In: Morton JF (ed.). Fruits of warm climates. Creative Resource Systems Inc. Winterville, USA. 505 p.*
- O'Donnell K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. Pp: 225-233. *In: Reynolds DR and Taylor JW (eds.). The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International. Wallingford. UK. 375 p.*
- Papp T, Vastag M, Michailides TJ, Ferenczy L and Vágvölgyi C. 2001. Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria*: identification of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers correlating with (+) and (-) mating types. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80:301-309. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1013066024258>.
- Peng XD, Huang SL and Lin SH. 2015. First report of corn kernel brown spot disease caused by *Mucor irregularis* in China. *Plant Disease* 99:159-160. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0814-PDN>
- Pinho DB, Pereira OL and Soares DJ. 2014. First report of *Gilbertella persicaria* as the cause of soft rot of fruit of *Syzygium cumini*. *Australasian Plant Disease Notes* 9:143-146. <http://dx.doi.org/10.1007/s13314-014-0143-0>.
- Ryan M, Ritchie BJ and Smith D. 2012. Maintenance and storage of fungal plant pathogens. Pp: 223-250. *In: Lane CR, Beales PA and Hughes KJD. Fungal Plant Pathogens. CAB International. South Asia. 324 p.*
- Suárez-Quiroz ML, Mendoza-Bautista I, Monroy-Rivera JA, de la Cruz-Medina J, Angulo-Guerrero O y González-Ríos O. 2013. Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv. Maradol (*Carica papaya* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 14:115-124. <http://www.redalyc.org/pdf/813/81329290004.pdf>.
- Tamura K and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/10/3/512.long>.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis Versión 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Vilgalys R and Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238-4246. <http://jb.asm.org/content/172/8/4238.long>.
- Voigt K, Cigelnik E and O'Donnell K. 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology* 37(12):3957-3964. <http://jcm.asm.org/content/37/12/3957.long>.
- Walther G, Pawłowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodríguez-Tudela JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A and de Hoog GS. 2013. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia* 30:11-47. <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X665070>.
- White T, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. Pp: 315-322. *In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (Eds.). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. San Diego. Academic Press. 392 p.* <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>.

# Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru

## Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú

Cinthia Sheila Quispe-Apaza\*, Roberto Carlos Mansilla-Samaniego, César Fernando López-Bonilla, Rosa Espejo-Joya, Juan Villanueva-Caceda, Criss Monzón, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina S/N, Lima, Perú, C.P. 12056. \*Autor para correspondencia: cinthiashe@gmail.com.

Recibido: 15 de Diciembre, 2016.

Aceptado: 26 de Junio, 2017.

Quispe-Apaza CS, Mansilla-Samaniego RC, López-Bonilla CF, Espejo-Joya R, Villanueva-Caceda J, Monzón C. 2017. Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 418-436.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1612-7

Primera publicación DOI: 04 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 04, 2017.

**Resumen.** Se analizó la diversidad genética del patógeno del café *Hemileia vastatrix*, a través de secuenciación de los espaciadores internos transcribibles del ADN ribosomal (ITS). El análisis se realizó en muestras de roya de 12 predios de dos zonas cafetaleras del Perú, Quillabamba (Cusco) y Villa Rica (Pasco). Se hallaron los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica. Además, se determinaron las semejanzas entre las poblaciones analizadas por medio de una red de haplotipos. Del análisis, se determinó que ambas regiones productoras presentan valores altos de diversidad genética; sin embargo, la zona de Quillabamba albergó la

**Abstract.** The genetic diversity of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* was analyzed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA. The analysis was carried out using samples of rust pustules from 12 properties of two coffee areas in Peru, Quillabamba (Cusco) and Villa Rica (Pasco). Haplotype diversity indexes were found and the similarities among the populations analyzed were determined using a haplotype network. From the analysis, it was determined that both producing regions presented high values of genetic diversity, but Quillabamba harbored the highest haplotype diversity of *H. vastatrix* ( $H_d = 0.977 \pm 0.012$ ). In addition, the haplotype network showed the structure of *H. vastatrix* populations for these two areas, which behave as a large undifferentiated population with the presence of ancestral haplotypes from which new variants of the fungus were generated. We also analyzed the sequences of the ITS region of *H. vastatrix* collected in Peru and those reported in the GenBank, but we did not find any distribution of the populations by geographic region; it was also suggested that the populations of Peruvian

mayor diversidad haplotípica de *H. vastatrix* ( $Hd = 0.977 \pm 0.012$ ). Asimismo, la red de haplotipos permitió evidenciar la estructura de las poblaciones de *H. vastatrix* para cada zona, las que juntas se comportan como una gran población indiferenciada con presencia de haplotipos ancestrales a partir de los cuales se fueron generando nuevas variantes del hongo. También, se analizaron las secuencias de la región ITS de *H. vastatrix* peruanas y las almacenadas en el GenBank, no encontrándose distribución de las poblaciones por región geográfica; además, se determinó que las poblaciones de *H. vastatrix* peruanas presentan haplotipos similares a los de Colombia y a las razas II y XXII.

**Palabras claves adicionales:** Roya amarilla, ITS, *Coffea spp.*, haplotipos

El café (*Coffea spp.*) es el principal producto de agro-exportación del Perú, con un área cultivada de 361 671 ha y una producción de 222 047 t producidas principalmente en las regiones de Cajamarca, Amazonas, Junín, Cusco y San Martín (MINAGRI, 2015). El 95% del café peruano proviene de cultivares de *Coffea arabica* (JNC, 2014) que son muy susceptibles a la roya amarilla, enfermedad cuyo agente causal es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* (Berkeley, 1869).

La roya amarilla del café fue reportada por primera vez en el Perú el año 1979, en el departamento de Junín (Scheiber y Zentmyer, 1984). Sin embargo, tuvo su mayor incidencia en el año 2013 ocasionando pérdidas que alcanzaron el 27% de la producción (INEI, 2014), afectando principalmente a los productores orgánicos. Desde entonces esta enfermedad se ha extendido a gran parte de las principales zonas cafetaleras del Perú, entre ellos a Villa Rica (Región Pasco) y a Quillabamba (Región Cusco).

rust presented haplotypes similar to those from Colombia and races II and XXII.

**Key words:** Yellow rust, ITS, *Coffea spp.*, haplotypes

Coffee (*Coffea spp.*) is the main agricultural product exported from Peru, where it is sown on 361 671 ha that produce 222 047 tons mainly in the regions of Cajamarca, Amazonas, Junín, Cusco and San Martín (MINAGRI, 2015). Ninety five percent of Peruvian coffee comes from *Coffea arabica* cultivars (JNC, 2014) that are very susceptible to yellow rust, a disease caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix* (Berkeley, 1869).

Yellow rust of coffee was first reported in Peru in 1979 in the Department of Junín (Scheiber and Zentmyer, 1984). However, in 2013 it had the highest incidence causing 27% production losses (INEI, 2014) that mainly affected organic producers. Since then, yellow rust has spread to most of Peru's main coffee areas, including Villa Rica (Pasco Region) and Quillabamba (Cusco Region).

Yellow rust is considered the most damaging coffee disease worldwide and may cause up to 40% production losses (Rivillas *et al.*, 2011). Two approaches have been proposed to prevent losses caused by this disease. The first is fungicide use, which is expensive and potentially harmful to the environment; the second is to develop improved varieties. However, for the latter it is necessary to know the sources of resistance and the pathogen's diversity.

The mechanisms that promote the emergence of new virulent strains of *H. vastatrix* are still unknown, and it has been suggested that mutations are the main cause of increased fungal diversity (Varzea and Marques, 2005). However, there is evidence of



La roya amarilla es considerada, a nivel mundial como la principal enfermedad del café, puede ocasionar pérdidas hasta del 40% en la producción (Rivillas *et al.*, 2011). En tal sentido se han planteado dos enfoques para evitar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad, la primera consiste en el uso de fungicidas, que es una alternativa muy costosa y potencialmente perjudicial para el ambiente, y la segunda a través, del desarrollo de variedades mejoradas. Sin embargo, esta última requiere del conocimiento de las fuentes de resistencia y de la diversidad del patógeno.

Los mecanismos que promueven el surgimiento de nuevas razas virulentas de *H. vastatrix* aún son desconocidos, y se ha planteado que la principal causa para el incremento de la diversidad del hongo son las mutaciones (Varzea y Marques, 2005); aunque, existe evidencia de un nuevo tipo de reproducción sexual oculto dentro de esporas asexuales (criptosexualidad) que podría explicar el origen de las nuevas variantes (Carvalho *et al.*, 2011). Además, se sabe que la elevada tasa de generación de nuevas razas, que ha despertado la atención de los programas de mejoramiento genético, tiene un efecto sobre la forma de generación de nuevas variedades de café, porque el hongo va adquiriendo capacidad de infectar plantas que originalmente fueron resistentes (Alvarado y Moreno, 2005).

Debido a esta capacidad de rápida adaptación a nuevos cultivares de café se ha llegado a considerar a *H. vastatrix* como un patógeno de alto potencial evolutivo cuyas evidencias de variación vienen siendo estudiadas desde 1930 (Rodrigues *et al.*, 1975), en los cuales se ha reportado la presencia de la raza II en casi todos los casos, por lo tanto, se ha sugerido que este podría ser el posible inóculo inicial a partir del cual se han generado naturalmente todas las nuevas razas del hongo encontradas (Zambolim *et al.*, 2005). Estos estudios iniciales fueron realizados por medio de las lecturas de las

a new type of hidden sexual reproduction within asexual spores (cryptosexuality) that could explain the origin of new races (Carvalho *et al.*, 2011). It is also known that the high rate at which new races develop –an issue that has attracted the interest of genetic improvement programs– has affected the way new coffee varieties are generated, because the fungus develops the ability to infect plants that were originally resistant (Alvarado and Moreno, 2005).

Due to the ability of the fungus to quickly adapt to new coffee cultivars, *H. vastatrix* has been considered a pathogen with high evolutionary potential whose variation has been studied since 1930 (Rodrigues *et al.*, 1975). Studies have reported the presence of race II in almost all cases. For this reason, it has been suggested that race II is likely the initial inoculum from which all the new races found today were naturally produced (Zambolim *et al.*, 2005). These initial studies were conducted through readings of the phenotypic expressions of a series of clones of differentiated coffee trees from the Centro de Invesgação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) in Portugal; by 2005, 45 races of *H. vastatrix* had been identified (Varzea and Marques, 2005). However, since these sets of differentiated coffee trees were not enough to characterize new virulent races of the fungus, new techniques (such as molecular markers) (Nandris *et al.*, 1998) and ITS sequencing of ribosomal DNA (Cristancho *et al.*, 2007) were used to determine their variability. Although it was not possible to identify races by using these molecular techniques, they did allow determining the pathogen's genetic diversity. Furthermore, ITS sequences have been used extensively to perform molecular analyses of the diversity of phytopathogenic fungi, characterize new fungal species and separate very closely related species or races of the same species (Grube and Kroken, 2000). Applying ITS sequences to *H.*

expresiones fenotípicas de una serie de clones de cafetos diferenciales del Centro de Invesgação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) en Portugal, identificando hasta antes de 2005 a 45 razas de *H. vastatrix* (Várzea y Marques, 2005). Sin embargo, estos conjuntos de cafetos diferenciales fueron insuficientes para la caracterización de nuevas razas virulentas del hongo, por lo que, se plantearon nuevas técnicas para determinar su variabilidad, como el uso de marcadores moleculares (Nandris *et al.*, 1998) y la secuenciación de los ITS del ADN ribosomal (Cristancho *et al.*, 2007). Si bien es cierto con estas técnicas moleculares no fue posible la identificación de razas, sin embargo, permitieron determinar la diversidad genética del patógeno. Además, las secuencias ITS han sido muy utilizadas en el análisis molecular de la diversidad de hongos fitopatógenos, así como en la caracterización de nuevas especies de hongos, y en la separación de especies muy cercanas o de razas de una misma especie (Grube y Kroken, 2000). Su aplicación a *H. vastatrix* viene ofreciendo nuevos panoramas sobre su diversidad que puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético. En el Perú, donde pocos estudios fueron realizados con esta finalidad, la generación de este conocimiento es fundamental para el manejo del cultivo y en los programas de mejoramiento genético del café peruano. Por ello en el presente trabajo se analizó la diversidad genética de *H. vastatrix* de dos zonas productoras importantes de café en el Perú mediante secuenciación de la región ITS, las que fueron comparadas con las secuencias reportadas en el GenBank para Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Esporas de *Hemileia vastatrix* fueron colectados en 5 predios de la zona cafetalera de Quillabamba,

*vastatrix* has provided new opportunities to use its diversity in genetic improvement programs. In Peru, where few studies have been conducted for this purpose, developing this knowledge is essential for crop management and for Peruvian coffee genetic improvement programs. For this reason, in this research, we analyzed the genetic diversity of *H. vastatrix* from two major coffee producing areas in Peru using sequences of the ITS region and then comparing them with the sequences reported by the GenBank for Colombia.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

*Hemileia vastatrix* spores were collected in five plots in the Quillabamba coffee producing area (Cusco Region) and in seven plots in the Villa Rica coffee producing area (Pasco Region) (Table 1). These areas are geographically distant and considered to be among the highest coffee-producing regions in Peru (Figure 1).

In each plot, we gathered 25 leaves from coffee trees of the Typica and Caturra varieties that are infected with *H. vastatrix* and extracted spores. To obtain enough DNA concentration, samples from one or two plots were grouped to form a compound sample (Table 1).

### Analysis of genetic diversity in Quillabamba and Villa Rica

#### DNA extraction

DNA was extracted using the protocol described by Cristancho *et al.* (2007) with modifications: uredospores were placed in 1.5 tubes to which 150  $\mu$ L of lysis buffer was added (50 mM of tris HCl pH 7,5; 50 mM of EDTA pH 8,0; 3% of

(Región Cusco) y en 7 predios de la zona cafetalera de Villa Rica (Región Pasco) (Cuadro 1). Estas zonas se encuentran distanciadas geográficamente y están consideradas dentro de las regiones cafetaleras con mayor producción de café en el Perú (Figura 1).

En cada predio se colectaron 25 hojas de cafetos de las variedades “Typica” y “Caturra” infectados con *H. vastatrix*, a las que se les extrajeron las esporas. Con la finalidad de obtener suficiente concentración de ADN, las muestras de uno o dos predios se agruparon en una muestra compuesta (Cuadro 1).

### Análisis de la diversidad genética de Quillabamba y Villa Rica

#### Extracción de ADN

El ADN se extrajo utilizando el protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007) con modificaciones: las

SDS; 1% of b mercaptoethanol); the uredospores were then ground for 30 to 45 minutes using a polypropylene pestle. The quality was determined by electrophoresis in 1% agarose gels stained with GelRed (Biotium®). Finally, DNA concentration was determined by spectrophotometry.

#### PCR and Purification

The ITS region was amplified using PCR and ITS1L and ITS4R universal primers (White *et al.*, 1990); as a reference, we used the protocol described by Cristancho *et al.* (2007). The amplification reaction was performed in a 10 µL volume containing 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of dNTPs, 0.4 µM of each primer, PCR 1X buffer, 1.5 units of Taq DNA polymerase and 40 ng of DNA. The amplification procedure consisted of an initial stage at 95 °C for 5 min, followed by 30 denaturation cycles at 94 °C for 1.5 min, alignment at 60 °C for 1 min and extension at 72°C for 2 min, plus a final

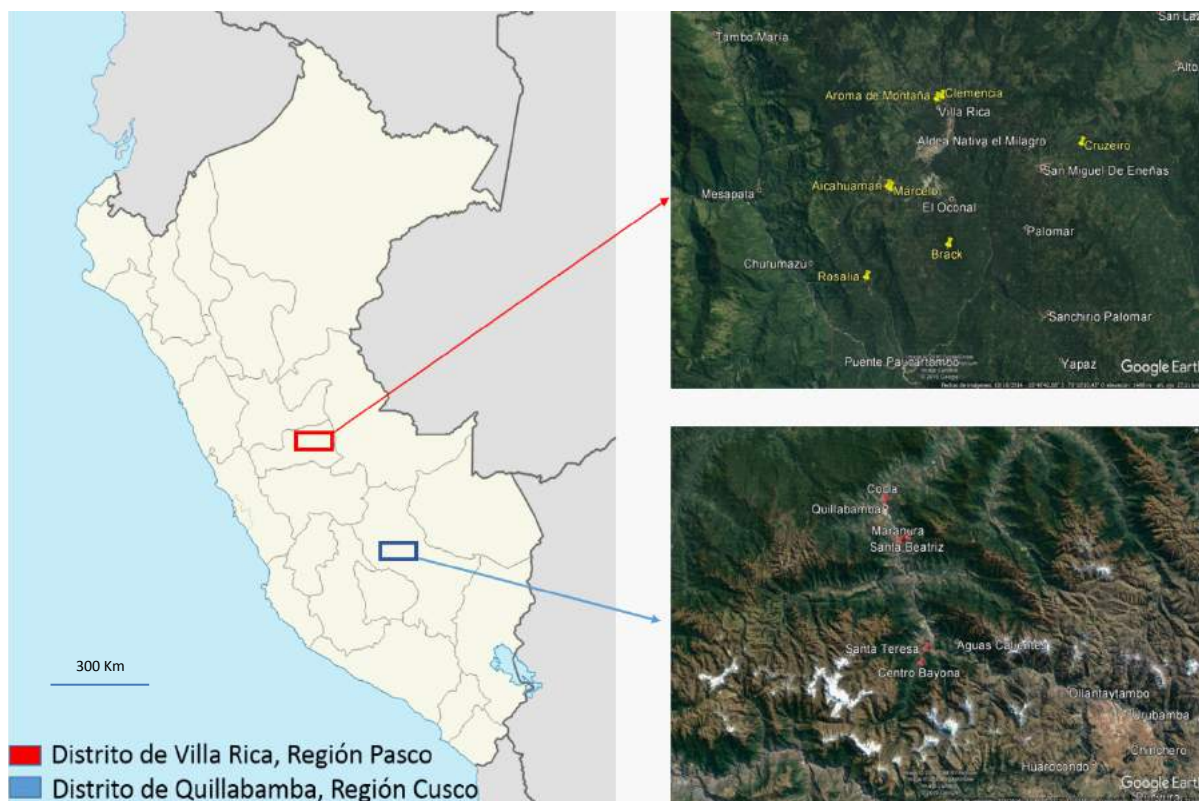
**Cuadro 1. Información georreferenciada de los predios en los que se muestrearon las pústulas de un total de 25 hojas de *Hemileia vastatrix* de las dos zonas cafetaleras del Perú y se indican las claves de las muestras compuestas generadas.**

**Table 1. Geographic information of the plots where samples of pustules of 25 leaves of *Hemileia vastatrix* were collected in the two Peruvian coffee production areas; it includes keys of the compounded samples formed.**

| Zona Cafetalera | Latitud (S) <sup>x</sup> | Longitud (W) <sup>y</sup> | Predio           | Clave de las muestras compuestas | Altitud (msnm) |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|------------------|----------------------------------|----------------|
| Quillabamba     | 12.86021                 | 72.7005                   | Cocla            | HVQ01                            | 1033           |
|                 | 12.95125                 | 72.66411                  | Maranura         | HVQ02                            | 1152           |
|                 | 12.94241                 | 72.64352                  | Santa Beatriz    | HVQ03                            | 1766           |
|                 | 13.18405                 | 72.6043                   | Santa Teresa     | HVQ04                            | 1865           |
|                 | 13.21229                 | 72.61512                  | Centro Bayona    | HVQ05                            | 2076           |
|                 | 10.78518                 | 75.2665                   | Brack            | HVV06                            | 1537           |
| Villa Rica      | 10.7396                  | 75.19847                  | Cruzeiro         | HVV07                            | 1478           |
|                 | 10.71801                 | 75.2713                   | Aróma de Montaña | HVV08                            | 1633           |
|                 | 10.79966                 | 75.30816                  | Rosalía          | HVV09                            | 1391           |
|                 | 10.71675                 | 75.2686                   | Clemencia        | HVV10                            | 1549           |
|                 | 10.75821                 | 75.29628                  | Aicahuaman       | HVV11                            | 1750           |
| 10.75919        | 75.295                   | Marcelo                   | 1776             |                                  |                |

<sup>x</sup> S= Sur.

<sup>y</sup> W= Oeste.



**Figura 1.** Localización en el mapa del Perú de los predios donde se colectaron las hojas de café con roya amarilla.  
**Figure 1.** Sites where leaves of coffee infected with yellow rust were collected in Peru.

uredosporas se depositaron en tubos de 1.5 ml, luego se adicionó 150  $\mu$ L de buffer de lisis (50 mM de tris HCl pH 7,5; 50 mM de EDTA pH 8,0; 3% de SDS; 1% de b Mercaptoetanol), posteriormente se trituraron las uredosporas con ayuda de un pistilo de polipropileno durante 30 a 45 minutos. La calidad se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed (Biotium®). Finalmente se determinó la concentración del ADN mediante espectrofotometría.

### PCR y Purificación

Se realizó la amplificación de la región ITS mediante PCR empleando los iniciadores universales ITS1L e ITS4R (White *et al.*, 1990), como

extension at 72°C for 5 min. The amplification products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels; a QIAquick gel extraction Kit® was used to purify the DNA fragment of the ITS region.

### Cloning and sequencing

The purified amplified products were cloned in chemocompetent *Escherichia coli* (JM109) using the Pgem T-easy vector system II Kit®, following the protocol recommended by the manufacturer. Then, for each compound sample, 10 white colonies were selected and each was sown in 5 ml of LB medium with 60  $\mu$ g/mL of ampicillin, and then incubated at 37 °C for 24 h. The *E. coli* plasmid containing the DNA fragment

referencia se utilizó el protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 10 µL conteniendo 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada iniciador, Buffer de PCR 1X, 1.5 Unidades de Taq ADN polimerasa y 40 ng de ADN. El programa de amplificación consistió de una etapa inicial a 95 °C por 5 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1.5 min, alineamiento a 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min; y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, la purificación del fragmento de ADN de la Región ITS se realizó utilizando el QIAquick gel extracción Kit®.

### Clonación y Secuenciación

Los productos de amplificación purificados fueron clonados en *Escherichia coli* quimio competente (JM109) utilizando el Pgem T-easy vector system II Kit® según el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, se seleccionaron 10 colonias blancas por cada muestra compuesta para ser sembradas cada una en 5 ml de medio LB con 60 µg/mL de ampicilina, e incubadas a 37 °C por 24 h. La extracción del plásmido de *E. coli* conteniendo el fragmento de ADN de interés, se realizó empleando el protocolo Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification system de PROMEGA. La confirmación de la presencia de la secuencia del ADN de la región ITS se realizó mediante digestión con la enzima EcoRI. Los fragmentos fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5%. La secuenciación de los fragmentos clonados fue realizada por la empresa GenBiotek (Argentina).

### Análisis de datos

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y editadas con el programa Codon Code Aligner v

of interest was extracted using the protocol of the Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification system from PROMEGA. The presence of the DNA sequence of the ITS region was confirmed through digestion with the EcoRI enzyme. The fragments were visualized in 1.5% agarose gel. The sequencing of the cloned fragments was performed by the GenBiotek company (Argentina).

### Data analysis

The obtained sequences were aligned and edited using the Codon Code Aligner v 2.0.6 program (Codon Code Corporation). As a reference, we used the DNA sequences of the ITS region of *H. vastatrix* stored in the GenBank (Cristancho *et al.*, 2007).

The obtained sequences were aligned using the MAFFT program implemented in the UGENE platform (Golosova *et al.*, 2014). Nucleotide and haplotype diversities (Nei and Li, 1979) were calculated using the DNAsp program version 5 (Librado and Rozas, 2009), and to detect similarities among haplotypes a network was created using the Median Joining algorithm (MJ) implemented in the PopArt program (Bandelt *et al.*, 1999) from which gap sites were excluded.

We also analyzed sequences of the ITS regions of *Hemileia vastatrix* stored in the GenBank, which correspond to *H. vastatrix* from Colombia, and of races II and XXII from CIFC (Cristancho *et al.*, 2007).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Analysis of the genetic diversity in Quillabamba and Villa Rica

From samples of *H. vastatrix* collected in plots in Quillabamba (5 plots) and Villa Rica (7 plots), we

2.0.6 (Codon Code Corporation). Como referencia se utilizaron las secuencias de ADN de la región ITS de *H. vastatrix* almacenadas en el GenBank (Cristancho *et al.*, 2007).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa MAFFT implementado en la plataforma UGENE (Golosova, *et al.*, 2014). La diversidad nucleotídica y la haplotípica (Nei y Li, 1979) se calcularon con el programa DNAsp v 5 (Librado y Rozas, 2009), y para la observación de las semejanzas entre los haplotipos se construyó una red utilizando el algoritmo median Joining (MJ) implementado en el programa PopArt (Bandelt *et al.*, 1999) para el cual se excluyeron los sitios gap.

Adicionalmente se analizaron secuencias de las regiones ITS de *Hemileia vastatrix* almacenadas en el GenBank, que corresponden a *H. vastatrix* de Colombia, y de las razas II y XXII del CIFC (Cristancho *et al.*, 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Análisis de la diversidad genética de Quillabamba y Villa Rica

A partir de las muestras de *H. vastatrix* colectadas en los predios de Quillabamba (5 predios) y de Villa Rica (7 predios) se obtuvieron 106 secuencias de ADN de la región ITS de *Hemileia vastatrix*. Las longitudes de las secuencias se encontraron entre el rango de 910 pb y 918 pb.

Del alineamiento de estas secuencias se obtuvieron 921 sitios alineados, de los cuales 21 resultaron ser *gaps* (inserciones o delecciones). Asimismo, se encontró 101 sitios polimórficos, con 11 posiciones parsimoniosas informativas (Cuadro 2).

Entre las dos zonas cafetaleras se halló un total de 68 haplotipos con una diversidad haplotípica (Hd

obtained 106 DNA sequences of the ITS region of *Hemileia vastatrix*. The length of the sequences ranged between 910 pb and 918 pb.

By aligning these sequences, we obtained 921 aligned sites, of which 21 were *gaps* (insertions or deletions). We also found 101 polymorphic sites with 11 informative parsimonious positions (Table 2).

In the two coffee producing areas, a total of 68 haplotypes was found with haplotype (Hd = 0.953 +/- 0.014) and nucleotide (Pi = de 0.00409 +/- 0.00024) diversity; 62 haplotypes showed unique sequences and 6 haplotypes consisted of more than two sequences (Table 3). Haplotypes Hap\_4, Hap\_8, Hap\_36 and Hap\_21 were found more often and are considered ancestors (Figure 2); they are also distributed across both coffee-producing areas, where they must have arrived at different times and became adapted to each area's environmental conditions. Haplotypes Hap\_4 and Hap\_36 are found more often in Villa Rica, while Hap\_8 and Hap\_21 are found more often in Quillabamba. The distribution of these ancestors in the two areas is explained by the coalescence genetic theory also observed by Santana *et al.* (2007) in populations of the fungus in Brazil.

From the analysis of *H. vastatrix* populations from Quillabamba and Villa Rica, we concluded that the highest genetic diversity is present in the Quillabamba coffee producing area, because of its higher nucleotide and haplotype diversity values (Table 2).

The absence of exclusive nodes by geographic region in the haplotype network in Figure 2 would indicate a large and undifferentiated population of *H. vastatrix* that may have resulted from the flow of spores between the two areas carried by people, seed and/or infected plants. These results are similar to those obtained in Brazil by Cabral *et al.* (2016), who did not observe that *H. vastatrix*

**Cuadro 2. Valores de los parámetros obtenidos sobre las medidas descriptivas de la variabilidad de *Hemileia vastatrix* de las secuencias de la región ITS asociadas a muestras de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC.**  
**Table 2. Parameters obtained from descriptive measures of *Hemileia vastatrix* variability using sequences of the ITS region associated with samples from Quillabamba, Villa Rica, Colombia and CIFIC.**

| Distritos             | Número de secuencias | Número de nucleótidos | Diversidad Nucleotídica (Pi) | Número de Haplotipos (H) | Diversidad de haplotipos (Hd) | Prueba de Tajima (D) | Sitios variables | Sitios variables Singleton | Posiciones informativas parsimoniosas |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Quillabamba           | 49                   | 919                   | 0.00540 +/- 0.00038          | 38                       | 0.977 +/-0.012                | -2.35287 P < 0.01    | 66               | 57                         | 9                                     |
| Villa Rica            | 57                   | 921                   | 0.00293 +/- 0.00026          | 36                       | 0.934 +/-0.024                | -6.09578 P < 0.01    | 47               | 42                         | 5                                     |
| Quillabamba-VillaRica | 106                  | 921                   | 0.00409 +/- 0.00024          | 68                       | 0.953 +/-0.014                | -2.66315 P < 0.001   | 101              | 90                         | 11                                    |
| Perú-Colombia-CIFIC   | 121                  | 921                   | 0.00351 +/-0.00022           | 73                       | 0.951 +/-0.013                | -2.72541 P < 0.001   | 103              | 92                         | 11                                    |

CIFIC: Centro de Invesgação das Ferrugens do Cafeeiro.

= 0.953 +/- 0.014) y nucleotídica ( $P_i$  = de 0.00409 +/- 0.00024); con 62 haplotipos con secuencias únicas y 6 haplotipos conformados por más de dos secuencias (Cuadro 3). Los haplotipos Hap\_4, Hap\_8, Hap\_36 y Hap\_21, que se encontraron en mayor frecuencia, se podrían considerar como los ancestrales (Figura 2); además, éstos se encuentran distribuidos en ambas zonas cafetaleras, a donde debieron haber llegado en tiempos diferentes adaptándose a las condiciones ambientales de cada zona. Los haplotipos Hap\_4 y Hap\_36 son más frecuentes en Villa Rica; mientras que, Hap\_8 y Hap\_21 son más frecuentes en Quillabamba. Esta distribución de los ancestrales en las dos zonas obedece a la teoría genética de coalescencia observada también por Santana *et al.* (2007) en poblaciones de este hongo en Brasil.

Del análisis de las poblaciones de *H. vastatrix* de Quillabamba y Villa Rica, se ha determinado que la mayor diversidad genética se encuentra en la zona cafetalera de Quillabamba, porque presenta los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica más altos (Cuadro 2).

Al no observarse en la red haplotípica de la Figura 2, nodos exclusivos por región geográfica, se estaría evidenciando una población de *H. vastatrix* grande e indiferenciada, que pudo haberse generado por el flujo de las esporas entre ambas zonas, favorecido por el movimiento de personas, semillas y/o plantas infectadas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cabral *et al.* (2016) en Brasil, quienes no observan una estructuración de la población de *H. vastatrix* respecto a su origen, hospedero ni razas fisiológicas; sin embargo, la diversidad genética fue relativamente menor a la hallada en el presente trabajo. No obstante, Maia *et al.* (2013) también en Brasil, obtuvieron resultados similares al presente trabajo, a través del estudio de 91 aislados del hongo, proponiendo que *H. vastatrix* se comporta como una gran población

populations were structured based on their origin, host or physiological race. However, the genetic diversity was relatively lower than the diversity found in the present study. However, Maia *et al.* (2013) (also in Brazil) obtained results similar to those of the present study using 91 fungal isolates; they proposed that *H. vastatrix* acts as a large indifferenced population with high genotypic diversity that is not structured based on its geographic origin and host. Therefore, the lack of structure of the two *H. vastatrix* populations by region may be explained by the fact that the fungus is spread over long distances.

Tajima's neutrality test was used for *H. vastatrix* populations from Villa Rica ( $D = -2.50181$ ;  $P < 0.001$ ) and Quillabamba ( $D = -2.35287$ ;  $P < 0.001$ ), and for both areas together ( $D = -2.66315$ ;  $P < 0.001$ ). These values are lower than 0, which indicate that *H. vastatrix* populations are in process of expansion. Also, they may have originated from a few recently introduced genotypes, or may descend from race II, which, according to Scheiber and Zentmyer (1984) exists in Peru since 1979. These Tajima's D test negative values may explain the presence of a high number of unique haplotypes in the haplotype network that are increasing the variability due to accelerated population growth. Therefore, this reflects the status of the *H. vastatrix* population and shows that coffee yellow rust epidemics in Peru, which started in 2013, were initially caused by a few individuals. However, it was not possible to establish the effect of the altitude above sea level on the population, because the Tajima test negative value indicates that there is no evidence of the existence of a selection process. The mechanisms that increase variability and create new *H. vastatrix* races are unknown. Therefore, spontaneous mutations may be the main mechanism responsible for *H. vastatrix* variability, especially in seasons of higher disease incidence.



**Cuadro 3. Distribución regional de frecuencias de haplotipos de *H. vastatrix* generados a partir de las secuencias ITS.**  
**Table 3. Cont'd... Regional distribution of the occurrence of *H. vastatrix* haplotypes obtained from ITS sequences.**

| Haplotipos <sup>x</sup> | Frecuencia | Distribución |            |          |      | Secuencias <sup>y</sup>                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------|------------|--------------|------------|----------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                         |            | Quillabamba  | Villa Rica | Colombia | CIFC |                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Hap_1                   | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_1.1                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_2                   | 2          | 2            | 0          | 0        | 0    | HVQ_1.2; HVQ_1.5                                                                                                                                                                                                                                  |
| Hap_3                   | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_1.3                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_4                   | 23         | 7            | 13         | 1        | 2    | HVQ_1.4; HVQ_2.4; HVQ_2.10; HVQ_3.3;<br>HVQ_3.5; HVQ_3.10; HVQ_5.9; HVV_6.3;<br>HVV_6.9; HVV_8.5; HVV_9.2; HVV_9.4;<br>HVV_10.2; HVV_10.4; HVV_10.9; HVV_10.8;<br>HVV_11.11; HVV_11.5; HVV_11.6; Race II-1126;<br>HVV_11.9; Race XXII-535; CT_2_N |
| Hap_5                   | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_1.6                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_6                   | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_1.7                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_7                   | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_1.8                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_8                   | 9          | 5            | 4          | 0        | 0    | HVQ_1.9; HVQ_1.10; HVQ_2.2; HVQ_2.7;<br>HVQ_3.1; HVV_6.6; HVV_8.3; HVV_8.8;<br>HVV_8.10                                                                                                                                                           |
| Hap_9                   | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_2.1                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_10                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_2.5                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_11                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_2.6                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_12                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_2.8                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_13                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_2.9                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_14                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_3.2                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_15                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_3.4                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_16                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_3.6                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_17                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_3.7                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_18                  | 2          | 1            | 0          | 1        | 0    | HVQ_3.8; VColPa1_2                                                                                                                                                                                                                                |
| Hap_19                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_3.9                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_20                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.1                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_21                  | 6          | 2            | 1          | 3        | 0    | HVQ_4.6; HVQ_5.6; HVV_9.1; CT_12_v;<br>CTInNa1; CT_7_N                                                                                                                                                                                            |
| Hap_22                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.10                                                                                                                                                                                                                                          |
| Hap_23                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.2                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_24                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.4                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_25                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.5                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_26                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.9                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_27                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.7                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_28                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.3                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_29                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_4.8                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_30                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_5.1                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_31                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_5.2                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_32                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_5.3                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_33                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_5.4                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_34                  | 2          | 1            | 1          | 0        | 0    | HVQ_5.5; HVV_11.3                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hap_35                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_5.7                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hap_36                  | 10         | 1            | 7          | 2        | 0    | HVQ_5.8; HVV_6.2; HVV_8.1; HVV_8.2;<br>HVV_8.4; HVV_8.6; HVV_8.7; HVV_11.8;<br>CTInNa2; CT_13_v                                                                                                                                                   |
| Hap_37                  | 1          | 1            | 0          | 0        | 0    | HVQ_5.10                                                                                                                                                                                                                                          |

Cuadro 3. Continuación.

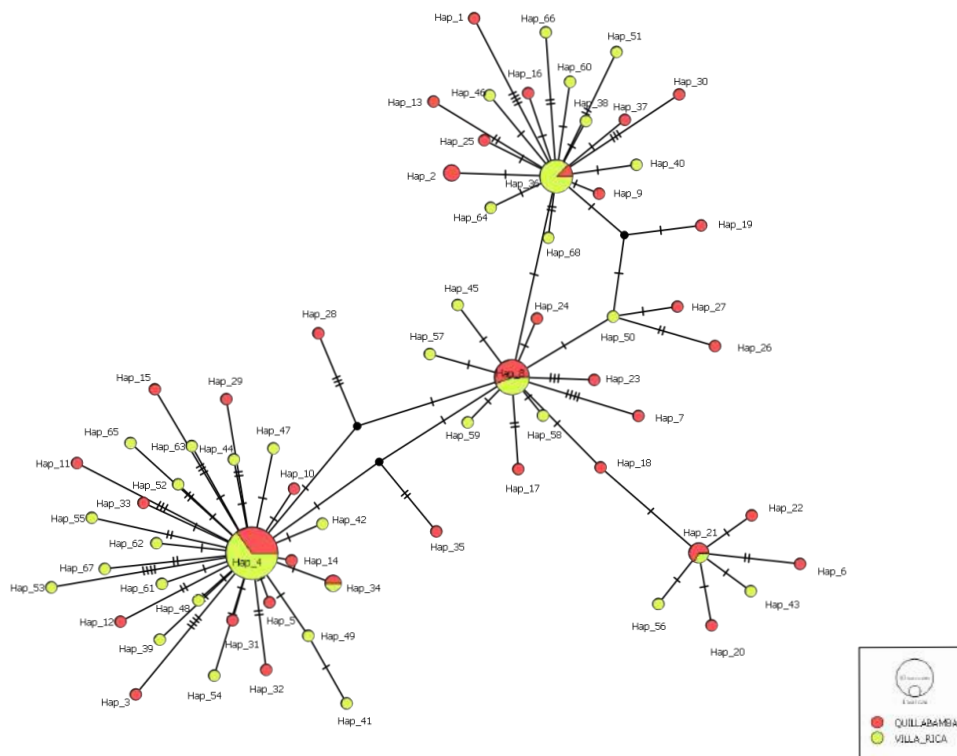
| Haplotipos <sup>x</sup> | Frecuencia | Distribución |            |          | CIFC | Secuencias <sup>y</sup> |
|-------------------------|------------|--------------|------------|----------|------|-------------------------|
|                         |            | Quillabamba  | Villa Rica | Colombia |      |                         |
| Hap_38                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_6.1                 |
| Hap_39                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_6.4                 |
| Hap_40                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_6.5                 |
| Hap_41                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_6.7                 |
| Hap_42                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_6.8                 |
| Hap_43                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_6.10                |
| Hap_44                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.1                 |
| Hap_45                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.2                 |
| Hap_46                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.3                 |
| Hap_47                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.4                 |
| Hap_48                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.5                 |
| Hap_49                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.6                 |
| Hap_50                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.7                 |
| Hap_51                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.9                 |
| [Hap_52                 | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_7.10                |
| Hap_53                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_9.5                 |
| Hap_54                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_9.6                 |
| Hap_55                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_9.7                 |
| Hap_56                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_9.9                 |
| Hap_57                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_9.10                |
| Hap_58                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_10.1                |
| Hap_59                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_10.5                |
| Hap_60                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_10.6                |
| Hap_61                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_10.10               |
| Hap_62                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_10.7                |
| Hap_63                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_10.3                |
| Hap_64                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_11.10               |
| Hap_65                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_11.1                |
| Hap_66                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_11.2                |
| Hap_67                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_11.4                |
| Hap_68                  | 1          | 0            | 1          | 0        | 0    | HVV_11.7                |
| Hap_69                  | 1          | 0            | 0          | 1        | 0    | CTSol_1                 |
| Hap_70                  | 2          | 0            | 0          | 1        | 1    | CTInNa3; RaceXXII-637   |
| Hap_71                  | 1          | 0            | 0          | 1        | 0    | CT_18_N                 |
| Hap_72                  | 1          | 0            | 0          | 1        | 0    | CT_28_v                 |
| Hap_73                  | 1          | 0            | 0          | 1        | 0    | CT-9-8                  |

<sup>x</sup> Hap: Haplotipo / Hap: Haplotype.

<sup>y</sup> HVQ: *Hemileia vastatrix* de Quillabamba; HVV: *Hemileia vastatrix* de Villa Rica; CT: Muestras de roya amarilla de Colombia; Race XXII y Race II: Muestras que corresponden al CIFC / HVQ: *Hemileia vastatrix* from Quillabamba; HVV: *Hemileia vastatrix* from Villa Rica; CT: Samples of yellow rust from Colombia; Race XXII and Race II: Samples corresponding to CIFC.

indiferenciada con una alta diversidad genotípica, y de igual forma, sin estructuración con respecto a su origen geográfico y de hospedero. Por lo tanto, la falta de estructuración de las dos poblaciones de

Another reason could be the selection pressure exerted by the environment. In this regard, Varzea and Marques (2005) believe that in Brazil the presence of resistance genes in some varieties of



**Figura 2.** Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 68 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos perdidos o no muestreados están representados por nodos de color negro.

**Figure 2.** Haplotype network created using the Median Joinig method for 68 haplotypes detected for the ITS region of *Hemileia vastatrix* from Quillabamba and Villa Rica coffee production areas. Circles represent a unique haplotype; the size of the circles is proportional to the number of sequences of a haplotype; transverse lines represent the events of simple mutations, and black nodes lost or non-sampled haplotypes.

*H. vastatrix* por regiones podría explicarse por la dispersión del hongo a grandes distancias.

La prueba de neutralidad de Tajima se realizó para las poblaciones de *H. vastatrix* de Villa Rica ( $D=-2.50181$ ;  $P<0.001$ ), Quillabamba ( $D=-2.35287$ ;  $P<0.001$ ), así como, de ambas zonas juntas ( $D=-2.66315$ ;  $P<0.001$ ). Estos valores menores a 0 indican que las poblaciones del hongo se encuentran en proceso de expansión. Además, éstas se habrían originado a partir de pocos genotipos que fueron introducidos recientemente, o serían los descendientes de la raza II, la cual, según Scheiber

the host species increases the number of virulent mutants in the population. Another factor that could explain the frequent and rapid emergence of new variants is cryptosexuality (Carvalho *et al.*, 2011), which may have an important role in creating *H. vastatrix* genetic variability.

### Comparing *H. vastatrix* haplotypes from Peru to haplotypes from Colombia

In the analysis of the ITS sequences of Peruvian *H. vastatrix* populations, we included 15 DNA

y Zentmyer (1984), existe desde el año 1979 en el Perú. También, estos valores negativos de  $D$  de Tajima explicarían la presencia en la red haplotípica de un elevado número de haplotipos únicos que vienen incrementando la variabilidad, y que es el resultado de un crecimiento acelerado de la población. Por lo tanto, se refleja el estado de la población de *H. vastatrix* y se estaría demostrando que el origen de la epidemia de roya amarilla del café en el Perú que se inició en el año 2013 fue a partir de pocos individuos. Sin embargo, no se ha podido establecer un efecto de la altitud sobre el nivel del mar en la población, puesto que el valor negativo de la prueba de Tajima indicaría que aún no es evidente la existencia de un proceso selección.

Los mecanismos que conducen al incremento de la variabilidad y la creación de nuevas razas de *H. vastatrix* no se conocen. Por lo tanto, se podría considerar a las mutaciones espontáneas como el principal mecanismo responsable de la creación de variabilidad en el hongo, principalmente en las épocas de mayor incidencia de la enfermedad. Además, se debe sumar la presión de selección ejercida por el medio ambiente; al respecto, en Brasil, Varzea y Marques (2005) consideran que la presencia de genes de resistencia de algunas variedades en el hospedero, incrementan el número de mutantes virulentos en la población. Otro factor que podría explicar el surgimiento frecuente y rápido de nuevas variantes es la criptosexualidad (Carvalho *et al.*, 2011), la cual podría estar jugando un papel importante en la generación de variabilidad genética de *H. vastatrix*.

### **Comparación de haplotipos de *H. vastatrix* del Perú con los de Colombia.**

Al análisis de las secuencias ITS de las poblaciones de *H. vastatrix* peruanas se incluyeron 15 secuencias de ADN de la región ITS del hongo que

sequences from the ITS region of the fungus that are stored in the GenBank; of these, 12 sequences correspond to *H. vastatrix* from Colombia, and 3 from CIFC. The latter are race II and XXII haplotypes (Figure 3). The analysis found a total of 73 haplotypes, 65 of which were unique (they had no replications). Also, it was confirmed that haplotype Hap\_4 contains the races II and XXII. It is frequently present and distributed across all the studied areas (7 sequences from Quillabamba, 13 from Villa Rica, 1 from Colombia and 2 from CIFC). Therefore, we may assume that the other haplotypes emerged from this ancestral haplotype, which confirms the findings of Zambolim *et al.* (2005) in Brazil, who suggested that the other races emerged from race II, which prevails in Latin America (Cristancho *et al.*, 2007). It was also observed that haplotypes Hap\_36 and Hap\_21, which are present in Colombia, Villa Rica and Quillabamba, are nodes that appeared later. Haplotype Hap\_8 is present only in Quillabamba and Villa Rica; after being introduced or emerging in Peru, this haplotype was able to better adapt to the environmental conditions of Peru's coffee producing areas. Based on what we observed in the main nodes (in which the presence of *H. vastatrix* sequences from Colombia and Peru is repetitive), it may be that in Peru and Colombia the disease emerged in the same area four years apart (Scheiber and Zentmyer, 1984; Buriticá, 2010). No nodes by origin of provenance were observed in the network, which would indicate that *H. vastatrix* sequences from Colombia are similar to the sequences from Peru. Studies conducted in early 1970 indicate that the wind has an important role in spreading the disease. Martines *et al.* (1975) found uredospores with good germination viability at an altitude of more than 1000 m; it has also been suggested that the introduction and rapid spread of the fungus in South America was caused by the wind (Bowden *et al.*, 1971). Other disease

se encuentran almacenadas en el GenBank, de las cuales 12 corresponden a *H. vastatrix* colombianas y 3 a las del CIFIC, estas últimas son haplotipos de la raza II y XXII (Figura 3). En dicho análisis se hallaron un total de 73 haplotipos, de los cuales 65 fueron únicos (no presentaron repeticiones). Además, se evidenció que el haplotipo Hap\_4 contiene a la raza II y XXII; se encuentra en mayor frecuencia y está distribuida en todas las zonas estudiadas

spreading means have also been mentioned, for example, the disease was introduced into Brazil through plants from Africa carried by people (migrant workers) and seed (Schieber, 1972). Therefore, anthropogenic causes may have had a very important role in bringing the fungus to Peru. Based on the analysis of *H. vastatrix* populations from the studied regions, three hypotheses about the origin of the 2013 yellow rust epidemic in Peru

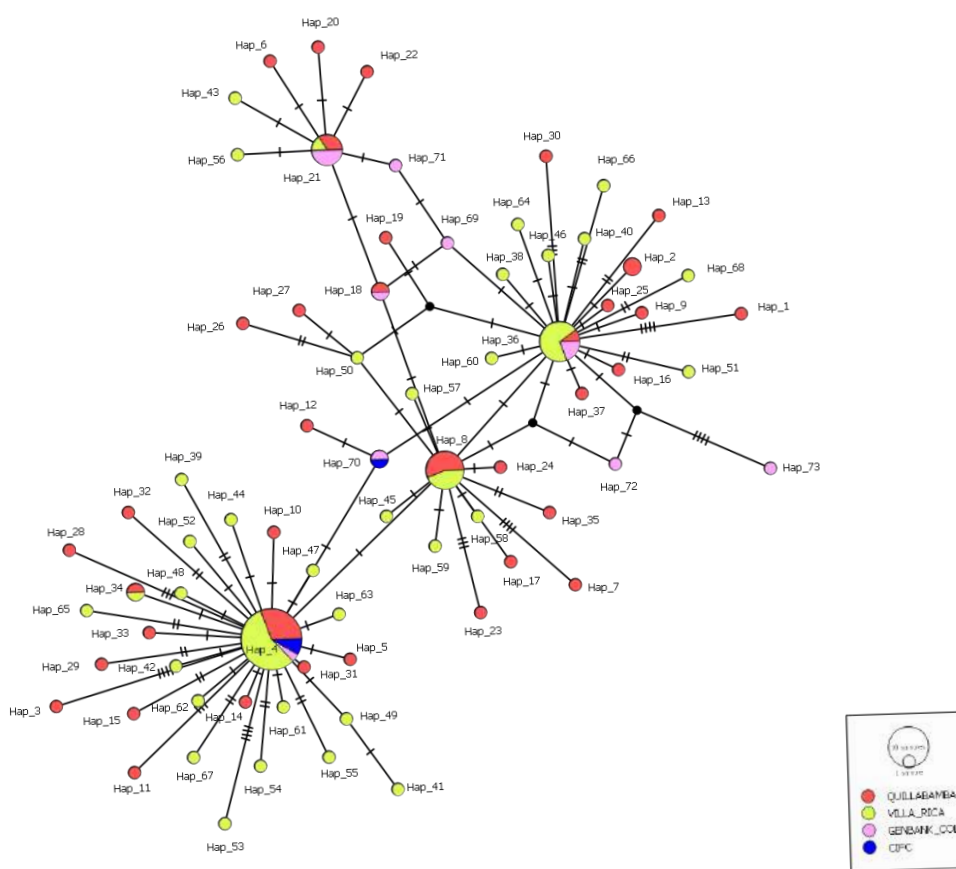


Figura 3. Red haplotípica por el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 73 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y del CIFIC. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos no muestreados están representados por nodos de color negro.

Figure 3. Haplotype network created using the Median Joinig method of 73 haplotypes detected for the ITS region of *Hemileia vastatrix* from Quillabamba, Villa Rica, Colombia and CIFIC. Circles represent a unique haplotype; the size of the circles is proportional to the number of sequences of a haplotype; transverse lines represent the events of simple mutations, and black nodes lost or non-sampled haplotypes.

(7 secuencias de Quillabamba, 13 de Villa Rica, 1 de Colombia y 2 de CIFC). Por lo tanto, a partir de este haplotipo ancestral, se podría suponer, que surgieron los demás, corroborando lo planteado por Zambolim *et al.* (2005) en Brasil, quien sugiere que a partir de la raza II surgieron las demás razas; y es la predominante en América Latina (Cristancho *et al.*, 2007). Así mismo, se observa que los haplotipos Hap\_36 y Hap\_21 presentes en Colombia, Villa Rica y Quillabamba, son nodos que aparecieron en momentos posteriores. Además, el haplotipo Hap\_8 se encuentra presente solamente en Quillabamba y Villa Rica, el cual luego de ingresar o surgir en el Perú se pudo adaptar mejor a las condiciones ambientales de las zonas cafetaleras peruanas. De acuerdo a lo observado en los principales nodos, en los cuales es reiterativa la presencia de secuencias de *H. vastatrix* colombianas y peruanas, se podría sugerir que en el Perú y Colombia la enfermedad pudo provenir de la misma zona llegando con cuatro años de diferencia (Scheiber y Zentmyer, 1984; Buriticá, 2010). Además, en la red no se observan nodos por origen de procedencia, lo que estaría indicando que las secuencias de *H. vastatrix* colombianas son similares a las secuencias de las peruanas. Existen reportes de estudios que se realizaron a inicios de 1970, que le atribuyen al viento un rol muy importante en la diseminación de la enfermedad. Martines *et al.* (1975) comprobaron la presencia de uredosporas a más de 1000 m de altura con una buena viabilidad de germinación, asimismo la dispersión por el viento fue sugerida como la causa de introducción y rápida diseminación del hongo a Sudamérica (Bowden *et al.*, 1971); también se mencionan otros medios de dispersión de la enfermedad, por ejemplo la introducción de la enfermedad a Brasil a través de plantas procedentes de África, por personas (trabajadores migrantes) y por semillas (Schieber, 1972), por lo tanto, la dispersión antropogénica pudo tener un rol

may be proposed. The first hypothesis assumes that a new *H. vastatrix* race derived from Race II was introduced in Peru and quickly adapted to the environmental conditions of coffee producing areas at altitudes higher than 1000 masl. Also, because the main ancestral haplotypes were found more frequently in Villa Rica, they must have arrived earlier in this area than in Quillabamba. However, in the haplotype network there is more than one main node that is considered ancestral (Hap\_4, Hap\_8, Hap\_21 and Hap\_36). The four haplotypes must have arrived in Peru progressively and in a short time. Haplotype Hap\_4, that corresponds to race II, is more frequently present in both coffee producing areas and includes a CT\_2N sequence from Colombia in its background.

The second hypothesis states that the *H. vastatrix* population evolved from race II and that a variant emerged that is able to infect high-altitude coffee trees. However, based on what we observed in the haplotype network (Figure 3), at least four variants corresponding to the ancestral haplotypes must have developed in high altitude. However, two of those sequences of both Colombia and Peru (Hap\_4 and Hap\_36) may have been introduced to Colombia from Peru, but this is very unlikely because the movement of all plant materials is under government control (Cristancho *et al.*, 2007).

The third hypothesis states that changes in weather conditions may have favored the fungus to reproduce and spread toward areas above 1000 masl. This hypothesis is supported by what is observed in the haplotype network (Figure 3), in which 4 nodes are formed that correspond to the ancestral haplotypes (Hap\_4, Hap\_8, Hap\_21 and Hap\_36) which may have existed years ago, because they are present in both coffee producing areas of Peru, and are spreading. Also, the most frequently found haplotype is Hap\_4, which corresponds to race II and has been present in Peru

muy importante en la llegada del hongo al Perú.

Basados en el análisis de poblaciones del hongo de las regiones estudiadas, se podrían generar tres hipótesis acerca del origen de la epidemia de roya amarilla del café surgida en el año 2013 en el Perú. La primera postularía que existió la introducción de una nueva raza de *H. vastatrix* al Perú, la cual provino de la Raza II, y debió adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales de las zonas cafetaleras, que se encuentran en altitudes superiores a los 1000 msnm. Además, por la mayor frecuencia observada de los principales haplotipos ancestrales en Villa Rica debió llegar antes a esta zona que a Quillabamba; sin embargo, en la red haplotípica existen más de un nodo principal considerados como ancestrales (Hap\_4, Hap\_8, Hap\_21 y Hap\_36). Estos cuatro haplotipos debieron llegar de una manera progresiva y en un corto periodo de tiempo al Perú. Así mismo, el haplotipo Hap\_4 que corresponde a la raza II, está en mayor frecuencia en ambas zonas cafetaleras e incluyen en su conformación a la secuencia CT\_2N colombiana.

La segunda hipótesis postularía que hubo una evolución de la población de *H. vastatrix* a partir de la raza II, generándose una variante capaz de infectar a los cafetos de altura; sin embargo, de acuerdo a lo observado en la red haplotípica (Figura 3), debieron formarse de manera casi simultánea al menos 4 variantes las que corresponden a los haplotipos ancestrales; no obstante, en dos de ellos (Hap\_4 y Hap\_36) se encuentran secuencias tanto de Colombia como de Perú, las cuales debieron generarse simultáneamente en ambos países o de lo contrario pudieron haber sido introducidos desde el Perú, lo cual es una posibilidad poco probable considerando que existen controles sobre el movimiento de todo material vegetal (Cristancho *et al.*, 2007).

La tercera hipótesis, apunta a los cambios en las condiciones climáticas que habrían favorecido la

since 1979. This hypothesis is similar to the one proposed by Cristancho *et al.* (2012) in Colombia as the origin of the coffee epidemic in 2008 that affected Colombian coffee producing areas above 1400 masl.

## CONCLUSIONS

By analyzing *Hemileia vastatrix* genetic diversity using ITS region sequences, we concluded that the haplotypic diversity values for Quillabamba and Villa Rica in Peru were high (0.934 +/- 0.024 and 0.977 +/- 0.012, respectively). However, the nucleotide diversity was low (0.00293 +/- 0.00026 and 0.00540 +/- 0.00038, respectively). However, the highest *H. vastatrix* diversity was found in the Quillabamba coffee producing area. In both studied areas, a large non-differentiated population was found by area of provenance, and their haplotypes are similar to those from Colombia. The sequences of races II and XXII stored in the GenBank that correspond to haplotype Hap\_4 are present both in Quillabamba and Villa Rica. Also, three hypotheses are proposed to explain the increase of rust intensity in Peru.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the students and partners of the Molecular Biology Laboratory of the Instituto de Biotecnología-UNALM and to the coffee growers of Villa Rica and Quillabamba for providing the biological materials. This research was funded by the FONDECYT 149-2013 project.

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

reproducción del hongo y su expansión hacia las zonas por encima de los 1000 msnm. Esta hipótesis se sustenta con lo observado en la red haplotípica (Figura 3), en la cual, se han formado 4 nodos correspondientes a los haplotipos ancestrales (Hap_4, Hap_8, Hap_21 y Hap_36), posiblemente existentes desde hace años atrás, porque se encuentran en ambas zonas cafetaleras peruanas y están en proceso de expansión. Además, el haplotipo de mayor frecuencia es Hap_4 que corresponde a la raza II, la cual existe desde el año 1979 en el Perú. Esta hipótesis, es similar a la que propusieron, Cristancho *et al.* (2012) en Colombia para el origen de la epidemia de roya del café ocurrido en el año 2008 y que afectó los cafetos colombianos sobre los 1400 msnm.

CONCLUSIONES

Mediante el análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* a través de la secuenciación de la región ITS, se determinó que los valores de diversidad haplotípica para las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica del Perú fueron altos (0.934 +/- 0.024 y 0.977 +/- 0.012 respectivamente); no obstante, la diversidad nucleotídica fue baja (0.00293 +/- 0.00026 y 0.00540 +/- 0.00038, respectivamente). Sin embargo, la mayor diversidad de *H. vastatrix* se encuentra en la zona cafetalera de Quillabamba. Entre las dos zonas evaluadas se ha encontrado una población grande no diferenciada por zona de procedencia, y sus haplotipos son similares a los de Colombia. Las secuencias de las razas II y XXII almacenadas en el GenBank que corresponden al haplotipo Hap_4, se encuentran tanto en Quillabamba como en Villa Rica. Además, se proponen tres hipótesis para explicar el incremento de la intensidad de la roya en el Perú.

AGRADECIMIENTOS

A los alumnos y colaboradores del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología - UNALM. A los caficultores de las zonas de Villa Rica y Quillabamba por las facilidades del material biológico. El trabajo de investigación fue financiado por el proyecto FONDECYT 149 - 2013.

LITERATURA CITADA

- Alvarado-Alvarado G and Moreno-Ruiz G. 2005. Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de Caturra x Híbrido de Timor. *Cenicafe* 56:110–126. <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/185>
- Bandelt H, Forster P and Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1):37–48. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/16/1/37.full.pdf+html>
- Berkeley MJ. 1869. [Untitled]. *Gardener's Chronicle* 45: 1157.
- Bowden J, Gregory PH and Johnson CG. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature* 224:500–501. <https://doi.org/10.1038/229500b0>
- Buriticá CP. 2010. La Roya del Cafeto en Colombia: Realizaciones de Impacto Nacional e Internacional en el Siglo XX. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín*, 63(1): 5285-5292. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914617007>
- Cabral PGC, Maciel-Zambolim E, Oliveira SAS, Caixeta ET and Zambolim L. 2016. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea spp.* *Plant Pathology* 65:196–204. <https://doi.org/10.1111/ppa.12411>
- Carvalho CR, Fernandes RC, Carvalho GMA, Barreto RW and Evans HC. 2011. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *Plos one* 6(11): 6(11):1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>
- Cristancho AM, Escobar OC and Ocampo JD. 2007. Evolución de razas de *H. vastatrix* en Colombia. *Cenicafé* 58(4): 340-359. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/178/1/arc058%2804%29340-359.pdf>
- Cristancho MA, Roza Y, Escobar C, Rivillas CA and Gaitán AL. 2012. Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. *New Disease Reports*, 25, 19. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.025.019>
- Goloseva O, Henderson R, Vaskin Y, Gabrielian A, Grekhov G, Nagarajan V, Oler AJ, Quiñones M, Hurt D, Fursov M and Huyen Y. 2014. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and CHIP-seq data analyses. *PeerJ* 2: 1-15. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.644>
- Grube M and Kroken S. 2000. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized

- fungi. *Mycological Research* 104: 1284–1294. <https://doi.org/10.1017/s0953756200003476>
- INEI, Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2014. Compendio estadístico del Perú. https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf
- JNC, Junta Nacional del Café. 2014. Plan Nacional de Renovación de cafetales. <http://juntadelcafe.org.pe/publicaciones/documento-plan-nacional-de-renovacion-de-cafetales>
- Librado P and Rozas J. 2009. DnaSP v. 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452. <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/53352/1/568571.pdf>
- Maia TA, Maciel-Zambolim E, Caixeta ET, Mizubuti ESG and Zambolim L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology* 42 (5): 533-542. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-013-0213-3>
- Martínez JA, Palazzo DA, Karazawa M, Monteiro MVM e Reu NRN. 1975. Presença de esporos de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. agente causal de ferrugem do cafeeiro, em diferentes altitudes nas principais areas cafeeiras dos estados de Sao Paulo e Parana, Brasil. *O Biológico* 41(3): 77-88.
- MINAGRI, Ministerio de Agricultura y Riego. 2015. Síntesis agroeconómica del café. <http://repositorio.minagri.gob.pe/handle/MINAGRI/51>
- Nandris D, Kohler F, Fernandez D, Lashermes P, Rodrigues Jr. CJ and Pellegrini PF. 1998. Coffee pathosystems modelling: 2. Assessment pathogen biodiversities. In: Proceedings of the 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland. Abstract 2.2.119.
- Nei M and Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10):5269-5273. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Rivillas CA, Serna CA, Cristancho MA and Gaitán A. 2011. La roya del cafeto en Colombia: Impacto, Manejo y Costos de Control. *Cenicafé* 36:1-51. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/594/1/036.pdf>
- Rodriguez CJ Jr, Bettencourt AJ and Rijo L. 1975. Races of pathogen and resistance to coffee rust. *Ann Rev Phytopathology* 13:49-70. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.py.13.090175.000405>
- Santana MF, Zambolim EM, Oliveira LO, Caixeta ET e Zambolim L. 2007. Análise molecular do rDNA de *Hemileia vastatrix*. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5, Águas de Lindóia, SP. Anais. Brasília, DF: Embrapa Café. file:///C:/Users/Cliente%205/Downloads/Analise-molecular.pdf
- Schieber E. 1972. Economic impact of coffee rust in Latin America. *Annual Review of Phytopathology* 10:491-510. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.002423>
- Schieber E and Zentmyer GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 68(2):89-93. https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n02_89.pdf
- Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp.
- Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp.
- Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp.
- Varzea V and Marques DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs Coffee durable resistance. In Zambolim L Zambolim E Várzea VMP Eds Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Brasil. 53-74p.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Inoculum* 64(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zambolim L, Zambolim EM e Várzea VMP. 2005. Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa, Vicoso Brasil. 450p.

Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico

Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México

María Fernanda Ruiz-Cisneros, Claudio Rios-Velasco*, David Ignacio Berlanga-Reyes, José de Jesús Ornelas-Paz, Carlos Horacio Acosta-Muñiz, Alejandro Romo-Chacón, Paul Baruk Zamudio-Flores, Daniel Alfonso Pérez-Corral, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua, Avenida Rio Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; Miguel Ángel Salas-Marina, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Ingenierías, Unidad Académica Villacorzo. Km 3.0 Carretera Villacorzo-Ejido Monterrey. C.P. 29000, Villacorzo, Chiapas, México; Jorge Eugenio Ibarra-Rendón, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Campus Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México; Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Campus Posta Zootécnica, C.P. 58880, Michoacán, México. * **Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx.

Recibido: 20 de Abril, 2017.

Aceptado: 09 de Julio, 2017.

Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE, Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 437-462.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1704-3

Primera publicación DOI: 04 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 04, 2017.

Resumen. Se estimó la incidencia de enfermedades de raíz en manzanos de Chihuahua, México, y se identificaron trescientos aislados (hongos y Oomicetos) tomados del tejido de raíz y suelo de la rizosfera de árboles con síntomas de infección y

Abstract. The incidence of root diseases was estimated in apple orchards from Chihuahua, Mexico. Three hundred isolates (fungi and Oomycetes) were identified in samples of root tissue and soil of trees with infectious damage symptoms and disease symptom-free trees. At the same time, putatively antagonistic agents were isolated and subsequently identified. The pathogenicity of fifteen selected isolates (eight fungi and seven Oomycetes), was tested in twelve apple rootstocks under greenhouse conditions. In addition, the *in vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* and *Bacillus* species was evaluated against seven of the selected Oomycetes. The incidence of infection damage of roots in 20 tested orchards was 17% (1-40%). *Fusarium* was the most widely distributed fungi (67.8%). The distribution of the other organisms was variable.

libres de síntomas de enfermedad. Paralelamente, se aislaron e identificaron hongos putativamente antagonistas. Se determinó la patogenicidad de quince aislados seleccionados (ocho hongos y siete Oomicetos) sobre doce portainjertos de manzano bajo condiciones de invernadero. Adicionalmente, se evaluó la actividad antagónica *in vitro* de especies de *Trichoderma* y *Bacillus* contra siete de los Oomicetos seleccionados. La incidencia de daños infecciosos en raíz en 20 huertos analizados fue del 17% (1-40%). *Fusarium* fue el hongo más ampliamente distribuido (67.8%). La distribución del resto de los organismos fue variable. Se identificaron cuatro especies de *Trichoderma*, siendo *T. gamsii* la más ampliamente distribuida (72.5%). *Bacillus* spp., redujo sustancialmente el crecimiento radial (>90%, $p=0.05$) de *Phytophthora cactorum*. Once portainjertos fueron susceptibles al menos a *Pythium ultimum* y *Phytophthora cactorum* C3. Los portainjertos G.935, Standard y M.25 fueron los más resistentes con 0% de incidencia. Las especies antagonistas de ambos géneros inhibieron *in vitro* significativamente el crecimiento de *P. cactorum* (86.4-93.8%, $p=0.05$), respecto a especies de *Pythium*, por lo que podrían ser utilizados como agentes de control biológico.

Palabras clave: *Bacillus* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora cactorum*, *Trichoderma* spp., región ITS, identificación molecular

Los manzanos (*Malus x domestica* Borkh.) son uno de los cultivos templados más importantes en México (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2011). Los árboles de manzano son afectados por diversos factores bióticos y abióticos que limitan su producción, especialmente las enfermedades de raíz. En los agroecosistemas, el incremento en la diversidad de microorganismos patogénicos (Oomicetos, hongos,

Four species of *Trichoderma* were identified, with *T. gamsii* being the most widely distributed (72.5%). *Bacillus* spp. substantially reduced the radial growth (>90%, $p=0.05$) of *Phytophthora cactorum*. Eleven rootstocks were susceptible to *Pythium ultimum* y *Phytophthora cactorum* C3. The G.935, Standard and M.25 rootstocks were the most resistant with 0% incidence. The antagonistic species of both genera inhibited the *in vitro* growth of *P. cactorum* (86.4-93.8%, $p=0.05$), respect to *Pythium* species, and therefore, they might be used as biological control agents.

Key words: *Bacillus* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora cactorum*, *Trichoderma* spp., ITS region, molecular identification

Apples (*Malus x domestica* Borkh.) are one of the most important temperate crops in Mexico (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2011). Apple trees are affected by several biotic and abiotic factors that limit their production, especially root diseases. In agroecosystems, the increased diversity of pathogenic microorganisms (Oomycetes, fungi, bacteria, nematodes, among others) can lead to root rot diseases. The root diseases caused by fungi and Oomycetes in apple trees, represent one important economic problem worldwide. These microorganisms destroy and collapse the root system of susceptible rootstocks, reducing the absorption of nutrients and water, blocking vascular bundles and, eventually, causing the death of apple trees (Rumberger *et al.*, 2007; Samaniego-Gaxiola, 2007; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a, b). The main pathogens of apple trees include *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., among others (Latorre *et al.*, 2001; Samaniego-Gaxiola, 2007). However, there still are in many apple producing

bacterias, nematodos, entre otros), pueden conducir a las enfermedades de pudrición de raíz. Las enfermedades de raíz causadas por hongos y Oomicetos en árboles de manzano, representan un importante problema económico alrededor del mundo. Estos microorganismos destruyen y colapsan el sistema radicular de portainjertos susceptibles, reduciendo la absorción de agua y nutrientes, bloqueando los haces vasculares y eventualmente, causando la muerte de los árboles de manzano (Rumberger *et al.*, 2007; Samaniego-Gaxiola, 2007; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a, b). Los principales patógenos del manzano incluyen a *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., entre otros (Latorre *et al.*, 2001; Samaniego-Gaxiola, 2007). Sin embargo, en muchas áreas productoras de manzana, todavía hay patógenos que no han sido identificados como agentes de enfermedades para los manzanos. Las principales enfermedades en árboles de manzano, incluyen las enfermedades de pudrición de cuello y corona, resultado de un complejo de patógenos (Lamichhane y Venturi, 2015). La incidencia, agentes causales y patogenicidad de agentes causales de enfermedades de pudrición de cuello y raíz, han sido pobremente estudiados durante las últimas tres décadas en huertos de manzano del norte de México. Se requiere información en este sentido, en particular en ésta área productora de manzana, para desarrollar un mejor manejo integrado de enfermedades, con el fin de reducir el uso excesivo de plaguicidas químicos de amplio espectro para el control de estas enfermedades. Indudablemente, estas mejoras en el manejo integrado de enfermedades incluyen el uso de microorganismos con actividad antagonista, los cuales son colonizadores eficientes, producen metabolitos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos y actúan como promotores del crecimiento vegetal (Ezziyyani *et al.*, 2004). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio

areas pathogens that have not been identified as disease agents for apple trees. The major diseases of apple trees, including crown-rot root diseases, result from a complex of pathogens (Lamichhane and Venturi, 2015). The incidence, causal agents and pathogenicity of causal agents of crown-rot root diseases have scarcely been studied during the last three decades in apple orchards from Northern Mexico. Information in this regard is needed in this particular apple producing area to develop a better-integrated disease management in order to reduce the excessive use of broad-spectrum chemical pesticides to control these diseases. Undoubtedly, this improved integrated disease management include the use of microorganisms with antagonistic activity, which are efficient colonizers, produce metabolites that inhibit the growth of phytopathogens and act as plant growth promoters (Ezziyyani *et al.*, 2004). Thus, the aim of the present study was to estimate the incidence of root pathogens in apple orchards from Chihuahua, Mexico, identifying the fungi and Oomycetes probably involved in the diseases and evaluating their pathogenicity in commercial apple rootstocks. The antagonistic effect of some microorganisms against some of the identified Oomycetes was also determined *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Experimental site and estimation of infection damage incidence

The incidence of roots with infection damage was determined on time in five orchards from the main apple-producing regions of Chihuahua, Mexico (Cuauhtémoc, Bachiniva, Namiquipa and Guerrero, Table 1) during June and July of 2013. The climate conditions and technification

fue estimar la incidencia de patógenos de la raíz en huertos de manzano de Chihuahua, México, identificando los hongos y Oomicetos probablemente involucrados en las enfermedades y evaluando su patogenicidad en portainjertos de manzano comerciales. También se determinó el efecto antagonista *in vitro* de algunos microorganismos contra algunos de los Oomicetos identificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental y estimación de incidencia de daño infeccioso

La incidencia de raíces con daño infeccioso se determinó una vez, en cinco huertos de las principales regiones productoras de manzana de Chihuahua, México (Cuahtémoc, Bachíniva, Namiquipa y Guerrero, Cuadro 1) durante junio y julio del 2013. Las condiciones climáticas y el nivel de tecnificación variaron entre las áreas evaluadas. Quinientos árboles, distribuidos en 10 hileras, se evaluaron en cada huerto (10,000 árboles en total) en un diseño completamente al azar (Cuadro 1). Los síntomas de daño infeccioso de raíz considerados fueron marchitez, pobre crecimiento de los brotes, follaje pálido o amarillo, follaje necrótico, defoliación prematura, muerte regresiva de hojas y brotes terminales, manchas negras o cafés en los tallos, formación de cánceres y crecimiento irregular.

Muestras de suelo y tejido

Se recolectó tejido enfermo (muestras de raíz y tallo de 10-20 cm de largo) y suelo cercano a la rizosfera (500-600 g) de 10 árboles con aparente daño infeccioso de raíces y de árboles libres de síntomas, de cada huerto para aislar los hongos y Oomicetos.

level varied among tested areas. Five hundred trees, distributed in 10 rows, were evaluated in each orchard (10,000 trees total) in a randomized design (Table 1). Root infection damage symptoms considered were wilting, poor shoot growth pale or yellow foliage, necrotic sparse foliage, premature defoliation, regressive death of leaves and terminal shoots, black or brown spots on the stems, cankers formation and irregular growth.

Soil and tissue samples

Diseased tissue (root and stem samples of 10-20 cm of length) and soil near the rhizosphere (500-600 g) of ten apple trees with apparent root infection damage and free of infection damage were collected from each orchard to isolate fungal and Oomycetes.

Isolation and purification of microorganisms

Three to five pieces (10-20 cm of length) of diseased tissue were washed with tap water to eliminate the excess of soil and subsequently cut into 1 cm pieces. The pieces were washed for 1 min with 0.5% sodium hypochlorite (NaOCl) solution, rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile brown wrapping paper in a biosafety hood (Envirco Corporation, Albuquerque, New Mexico, USA). Tissue subsamples (5 pieces each of 1 cm of length) were placed in triplicate in humid chambers (90-mm Petri dishes with moistened cotton). On the other hand, tissue subsamples (five pieces of 3-5 mm of length) were placed in triplicate on semi-selective media V8-agar [V8 juice, calcium carbonate (CaCO₃; Sigma-Aldrich) - agar (Sigma-Aldrich)] and potato-dextrose-agar (PDA; BD Bioxon). These two media contained antibiotics [pimaricin 0.1 g/L (Sigma-Aldrich, USA), rifampicin 0.01 g/L (Sigma, USA), oxytetracycline

Cuadro 1. Huertos de manzano muestreados, ubicación geográfica, portainjertos plantados, edad de los árboles e incidencia de árboles de manzano con posible enfermedad de raíz en cuatro localidades del estado de Chihuahua, México.
Table 1. Apple orchards sampled, geographical location, rootstock planted, age of the trees, and incidence of apple trees with putative root disease in four localities in the state of Chihuahua, Mexico.

| Localidades | Huertos | Portainjertos | Edad (años) | Nivel de tecnificación | Ubicación geográfica | msnm | Incidencia (%) |
|-------------|-------------------|---------------|-------------|------------------------|-------------------------|-------|----------------|
| Cuahtémoc | Picacho lot 7 | MM.111 | 1 | High ^x | 28°29'28"N, 106°40'08"W | 2,020 | 4 |
| | Picacho lot 6 | MM.111 | 12 | High ^x | 28°29'31"N, 106°39'45"W | 2,017 | 1 |
| | Picacho lot 1A | MM.106 | 43 | Medium ^y | 28°29'23"N, 106°39'07"W | 2,025 | 14 |
| | Campo 2A | Bud 108, M.7 | 10 | High ^x | 28°26'40"N, 106°59'18"W | 2,130 | 28 |
| | Campana (Campo 4) | Standard | 30 | High ^y | 28°33'49"N, 106°54'24"W | 1,995 | 32 |
| Namiquipa | Carlos Márquez | Standard | 27 | Medium ^y | 29°11'03"N, 107°25'14"W | 1,877 | 17 |
| | Manuel Rivera | Standard | 19 | Medium ^y | 29°08'53"N, 107°23'34"W | 1,868 | 15 |
| | Reyes Nevarez 1 | Standard | 18 | Medium ^y | 29°10'31"N, 107°22'27"W | 1,900 | 13 |
| | Reyes Nevarez 2 | Standard | 8 | High ^x | 29°09'32"N, 107°23'10"W | 1,873 | 4 |
| | Reyes Nevarez 3 | Standard | 30 | Medium ^y | 29°08'59"N, 107°23'30"W | 1,889 | 28 |
| Guerrero | El Encino | John Downie | 5 | Medium ^y | 28°33'23"N, 107°27'21"W | 2,084 | 12 |
| | El Tanque | Standard | 6 | Medium ^y | 28°33'36"N, 107°27'23"W | 2,082 | 19 |
| | Tres Compadres | Standard | 6 | Medium ^y | 28°32'66"N, 107°27'10"W | 2,099 | 14 |
| | Gameros | Standard | 4 | Medium ^y | 28°31'58"N, 107°26'57"W | 2,096 | 24 |
| | Las Margaritas | MM.111 | 3 | Medium ^y | 28°33'31"N, 107°29'37"W | 2,012 | 19 |
| Bachíniva | San Joaquin | Standard | 44 | Medium ^y | 28°51'58"N, 107°15'57"W | 1,991 | 40 |
| | Rosy | MM.111 | 28 | High ^x | 28°51'45"N, 107°16'08"W | 1,984 | 7 |
| | Bety | MM.111 | 15 | High ^x | 28°51'29"N, 107°16'17"W | 1,977 | 5 |
| | Manuel | MM.111 | 15 | High ^x | 28°51'11"N, 107°15'39"W | 1,979 | 2 |
| | La Ciénega | Standard | 34 | Medium ^x | 28°46'52"N, 107°15'21"W | 2,009 | 33 |

msnm: metros sobre el nivel del mar / masl: meters above sea level.

^xAlto: Irrigación por micro-aspersión, calefacción, malla antigranizo; ^yMedio: Riego rodado, calefacción, sin malla antigranizo, sin límite del uso de recursos y asistencia técnica ocasional (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2004) / ^xHigh: Micro-sprinkler irrigation, heating, hail mesh; ^yMedium: Rolled irrigation, heating, without hail mesh, without limiting the use of resources and casual technical assistance (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2004).

Aislamiento y purificación de microorganismos

Se lavaron con agua corriente tres a cinco piezas (10-20 cm de largo) de tejido enfermo para eliminar el exceso de suelo y subsecuentemente se cortaron en piezas de 1 cm. Los pedazos se lavaron por 1 min con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 0.5%, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se secaron en papel estroza estéril en

0.03 g/L (Sigma, Germany)] (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Thus, 15 subsamples of 1 cm and 15 subsamples of 3-5 mm from each tree with and without infection damage symptoms were evaluated. All assays were performed at 28 °C for 5 d in an environmental chamber without light (Precision Scientific, Winchester, VA, USA). The fungi were purified on PDA medium, using a monospore culture technique, followed by incubation at 28 °C for 72-96 h. PARPH medium

una cabina de bioseguridad (Enviroco Corporation, Albuquerque, New Mexico, EUA). Las submuestras de tejido (5 piezas de 1 cm de largo) se colocaron por triplicado en cámaras húmedas (cajas de Petri de 90-mm con algodón húmedo). Por otra parte, submuestras de tejido (cinco piezas de 3-5 mm de largo) se colocaron por triplicado en medios de cultivo semi-selectivos V8-agar [jugo V8, carbonato de calcio (CaCO₃; Sigma-Aldrich) – agar (Sigma-Aldrich)] y papa-dextrosa-agar (PDA; BD Bioxon). Estos dos medios contenían antibióticos [pimaricina 0.1 g/L (Sigma-Aldrich, EUA), rifampicina 0.01 g/L (Sigma, EUA), oxytetraciclina 0.03 g/L (Sigma, Alemania)] (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Por lo tanto, se evaluaron 15 submuestras de 1 cm y 15 submuestras de 3-5 mm de cada árbol con y sin síntomas de daño infeccioso. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 28 °C por 5 d en una cámara ambiental sin luz (Precision Scientific, Winchester, VA, EUA). Los hongos fueron purificados en medio PDA usando la técnica de cultivo monospórico, seguido por una incubación a 28 °C por 72-96 h. Para el aislamiento de Oomicetos, se usó el medio PARPH [17 g/L de medio de harina de maíz (Analytical Fluka, Sigma); 0.10 g/L pentacloronitrobenzenceno (PCNB), 0.27 g/L ampicilina (Sigma) y 0.01 g/L rifampicina (Sigma)]. Estos microorganismos fueron incubados bajo las mismas condiciones que los hongos.

Las especies de *Trichoderma* se aislaron por diluciones seriadas (1:10) de suelo tamizado (1 g) de árboles con y sin síntomas de daño infeccioso en tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada estéril (0.1% peptonina y 0.85% NaCl en agua destilada). Se sembraron por triplicado alícuotas (50 µL) de las diluciones (10⁴, 10⁵, and 10⁶) por la técnica de difusión en cajas de Petri de 90-mm que contenían medio PDA adicionado con antibióticos indicados previamente (Schoenborn *et al.*, 2004).

[17 g/L of corn meal agar medium (Analytical Fluka, Sigma); 0.10 g/L pentachloronitrobenzene (PCNB), 0.27 g/L ampicillin (Sigma) and 0.01 g/L rifampicin (Sigma)] was used to isolate Oomycetes. These microorganisms were incubated under the same conditions than fungi.

The *Trichoderma* species were isolated by serial dilutions (1:10) of sieved soil (1 g) from diseased and disease symptom-free trees in test tubes containing 9 mL of sterile peptone water (0.1% peptone and 0.85% NaCl in distilled water). Aliquots (50 µL) of the prepared dilutions (10⁴, 10⁵, and 10⁶) were spread in triplicate by diffusion technique on 90-mm Petri dishes containing PDA medium added of the antibiotics previously indicated (Schoenborn *et al.*, 2004).

Morphological and molecular identification of microorganisms

Fungi and Oomycetes were purified on PDA medium without antibiotics (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a) and identified at genus level using taxonomic keys (Barnett and Hunter, 1972; Dugan, 2006; Watanabe, 2010), according to their morphological characters observed in an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The identity of these microorganisms was confirmed molecularly.

The genomic DNA (gDNA) was extracted and used to perform the identity analysis of the fungal isolates based on their molecular characters. For this purpose, an explant of the purified fungi was placed on a Petri dish containing PDA medium, covered with sterile cellophane and incubated at 28 °C for 7 d. The mycelia was collected and placed in a porcelain mortar with a buffer (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) at 70 °C. The mycelia was macerated according to Raeder and Broda (1985). The

Identificación morfológica y molecular de microorganismos

Los hongos y Oomicetos fueron purificados en medio PDA sin antibióticos (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a) e identificados a nivel de género utilizando claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1972; Dugan, 2006; Watanabe, 2010), de acuerdo con sus caracteres morfológicos observados en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania). La identidad de estos microorganismos fue confirmada molecularmente.

El ADN genómico (ADNg) fue extraído y usado para llevar a cabo el análisis de identidad de los aislados fúngicos, basados en sus caracteres moleculares. Para este propósito, un explante del hongo purificado se colocó en una caja de Petri que contenía medio PDA, se cubrió con celofán estéril y se incubó a 28 °C por 7 d. Se recolectó el micelio y se colocó en un mortero de porcelana con un amortiguador (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) a 70 °C. El micelio se maceró de acuerdo con Raeder y Broda (1985). El ADNg obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y subsecuentemente se usó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS4 y 5, por sus siglas en inglés) del ADNr, usando los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 45 s, y una etapa final de extensión a 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y subsecuentemente purificados usando el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, California, EUA),

obtained gDNA was visualized by electrophoresis on a 1% agarose gel and subsequently used to amplify the internal transcribed spacers (ITS 4 and 5) of the rDNA, using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). The amplification conditions included an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were examined by electrophoresis on a 1% agarose gel and were subsequently purified using the DNA Clean & Concentrator kit (Zymo Research, California, USA), according to the manufacturer's instructions. These products were sequenced at Macrogen (Rockville, MD, USA). The obtained sequences were compared against the NCBI database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to verify the percent identity corresponding to the identified species. The nucleotide sequences obtained in the present study have not been deposited in NCBI.

Pathogenicity tests in apple rootstocks.

The Koch's postulates were performed under greenhouse conditions using 15 pathogens (eight fungi and seven Oomycetes) isolated from the rhizosphere of apple trees with and without root infection damage symptoms. One year old trees of the 12 most planted rootstocks in Mexico (G.30, G.41, G.202, G.222, G.935, M.7, M.25, MM.106, MM.111, Bud 118, Bud 9 and Standard) were purchased from two nurseries in Cuauhtemoc, Chihuahua ("Viveros Sacramento" and "Vivero Los Cienes"). Five trees of each rootstock were inoculated with each pathogen. Additionally, five trees of each rootstock were used as control group (without inoculum).

de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos productos fueron secuenciados en MacroGen (Rockville, MD, EUA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra las bases de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies identificadas. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en el presente estudio no han sido depositadas en el NCBI.

Pruebas de patogenicidad en portainjertos de manzano

Los postulados de Koch se realizaron bajo condiciones de invernadero utilizando 15 patógenos (ocho hongos y siete Oomicetos) aislados de la rizosfera de árboles de manzano con y sin síntomas de daño infeccioso en raíz. Se adquirieron árboles de manzano de 1 año de edad de los 12 portainjertos más plantados en México (G.30, G.41, G.202, G.222, G.935, M.7, M.25, MM.106, MM.111, Bud 118, Bud 9 y Estándar), de dos viveros en Cuauhtémoc, Chihuahua (“Viveros Sacramento” y “Vivero Los Cienes”). Se inocularon cinco árboles de cada portainjerto con cada patógeno. Adicionalmente, se utilizaron cinco portainjertos como grupo testigo (sin inóculo).

Los árboles se plantaron en bolsas negras de polietileno (5 L) conteniendo sustrato previamente esterilizado a 121 °C y 15 psi. El sustrato estaba compuesto por suelo franco, vermiculita y peat moss (1: 1: 1). Dos meses después del trasplante, los árboles fueron inoculados con 10 mL de inóculo de hongos u Oomicetos sin cuantificar (Hantula *et al.*, 2000). El inóculo tenía 3 d edad y fue crecido en caldo vegetal V8 [jugo V8 (Campbell’s™) y carbonato de calcio (CaCO₃, Sigma Aldrich)] a 28 °C en un agitador orbital a 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). Los portainjertos inoculados se mantuvieron por otros dos meses bajo con-

The trees were planted in dark polyethylene bags (5 L) containing substrate previously sterilized at 121 °C and 15 psi. The substrate was composed by loam soil, vermiculite and peat moss (1: 1: 1). Two months after planting, the trees were inoculated with 10 mL of unquantified fungi or Oomycetes inoculum (Hantula *et al.*, 2000). The inoculum was 3 d old and grown in vegetable broth V8 [V8 juice (Campbell’s™) and calcium carbonate (CaCO₃, Sigma Aldrich)] at 28 °C under orbital shaking at 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). The inoculated rootstocks were maintained for another two months under greenhouse conditions (Uthkede and Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). During this time, the characteristic symptoms resulting from the fungal and Oomycete infections were monitored weekly. The Oomycetes and fungal isolates causing the death of trees or severe symptoms of damage in roots, stems, leaves and shoots after two months of the inoculation were considered as pathogenic.

***In vitro* antagonistic activity**

Four fungal isolates and two antagonistic bacteria isolates were confronted against seven Oomycetes isolates. The antagonists included a *Trichoderma asperellum* and two *Bacillus* species previously identified (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

The activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* isolates was evaluated *in vitro* against the Oomycetes obtained from apple orchards. For this purpose, confrontations were performed (*Trichoderma* spp. vs Oomycetes) using a dual culture technique in Petri dishes (90 mm) containing Potato-Dextrose-Agar (PDA). A paper filter disc (6 mm) containing the mycelium and conidia unquantified of the pathogen was placed on one side of the dish and another filter paper disc containing the mycelium and conidia unquantified of the antagonist was

diciones de invernadero (Uthkede y Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). Durante este tiempo, se monitorearon semanalmente los síntomas característicos resultado de las infecciones de hongos y Oomicetos. Se consideraron como patogénicos a los aislados de hongos y Oomicetos que causaron la muerte de los árboles o que causaron síntomas severos de daño en las raíces, tallos, hojas y brotes después de 2 meses de la inoculación.

Actividad antagónica *in vitro*

Se confrontaron cuatro aislados de hongos y dos de bacterias antagonistas contra siete aislados de Oomicetos. Se incluyeron los antagonistas *Trichoderma asperellum* y dos especies de *Bacillus* previamente identificados (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

Se evaluó la actividad *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* contra los Oomicetos obtenidos de huertos de manzano. Para este propósito, se realizaron confrontaciones (*Trichoderma* spp. vs Oomicetos) usando la técnica de cultivo dual en cajas de Petri (90 mm) conteniendo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Se colocó un disco de papel filtro (6 mm) conteniendo el micelio y conidias sin cuantificar del patógeno en un lado de la caja y se colocó otro disco de papel filtro conteniendo el micelio y conidias sin cuantificar del antagonista, en el lado opuesto de la caja. Las confrontaciones de *Bacillus* spp. vs Oomicetos, se realizaron colocando un círculo de papel filtro de 6 mm de diámetro del patógeno (micelio y conidias sin cuantificar) en el centro de la caja Petri conteniendo PDA, mientras que la bacteria fue inoculada, el mismo día que el fitopatógeno, en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri usando círculos de papel filtro (6 mm de diámetro con inóculo de 48 h de edad) (Figura 1).

Tanto los testigos de patógenos y antagonistas se colocaron individualmente en el centro de la caja de Petri y se realizaron por triplicado con 10 unidades

placed on the opposite side of the dish. The *Bacillus* spp. vs Oomycetes confrontations were performed by placing one filter paper circle of 6 mm in diameter of the pathogen (mycelium and conidia unquantified) in the center of a Petri dish containing PDA, whereas the bacteria were inoculated on the cardinal points of the Petri dish using filter paper circles (6 mm in diameter with the 48 h old inoculum), the same day that the phytopathogens (Figure 1).

Controls, both antagonist and pathogen, were placed individually in the center of the Petri dish, and were performed in triplicate with ten experimental units each. The dishes were incubated at 28 °C in a Precision Scientific incubator (Model 31534), and systematic measurements of the radial growth of the fungal colonies confronted with antagonistic fungi and bacteria, and the control dishes, respectively, were performed every 24 h for eight days.

The possible antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp., was evaluated in terms of radial growth of the pathogen (RGP), radial growth of the antagonist (RGA), and percentage inhibition of radial growth (PIRG). The PIRG was evaluated according to Ezziyyani *et al.* (2004) using the formula $PIRG = (R1 - R2) / R1 \times 100$, where R1 is the radial growth of the control pathogen, and R2 is the radial growth of the pathogen in the confrontation, while that of the antagonist type was measured according to Bell's scale (Bell *et al.*, 1982).

Statistical analysis

Both bioassays were performed in triplicate, with ten Petri dishes per replicate for each bacterium-fungus *in vitro* evaluation, using a completely randomized design with the following six treatments: four antagonistic fungal isolates

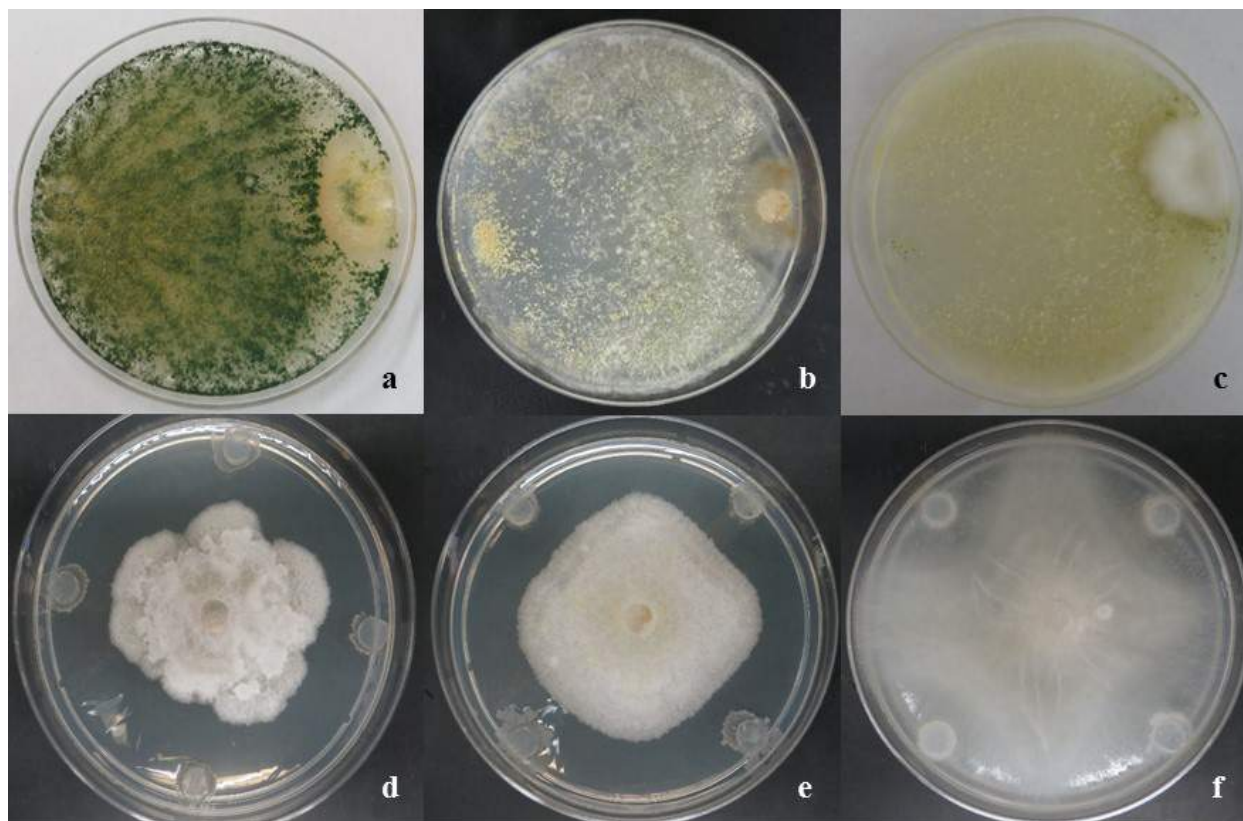


Figura 1. Micoparasitismo de especies de *Trichoderma* (a-c); a) *T. asperellum* vs *Pythium ultimum*; b) *T. harzianum* vs *Pythium* sp.; c) *T. atroviride* vs *Phytophthora cactorum*; y halos de inhibición de especies de *Bacillus* (d-f); d) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; e) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; f) *B. methylotrophicus* vs *Pythium ultimum* al sexto día post-inoculación *in vitro*.

Figure 1. Mycoparasitism of *Trichoderma* species (a-c); a) *T. asperellum* vs *Pythium ultimum*; b) *T. harzianum* vs *Pythium* sp.; c) *T. atroviride* vs *Phytophthora cactorum*; and inhibition halos of *Bacillus* species (d-f); d) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; e) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; f) *B. methylotrophicus* vs *Pythium ultimum* at 6th d post-inoculation *in vitro*.

experimentales cada una. Las cajas se incubaron a 28 °C en una incubadora Precision Scientific (Modelo 31534) y se realizaron mediciones sistemáticas cada 24 h por ocho días, del crecimiento radial de las colonias de hongos confrontadas con los hongos y bacterias antagonistas y las cajas testigo, respectivamente.

Se evaluó la posible actividad antagonista de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en términos de

and two antagonistic bacteria isolates confronted against seven Oomycetes isolates, with one control for each microorganism, where each treatment was an antagonist microorganism with 30 Petri dishes. The PIRG data and inhibition halo were analyzed using the Statistical Analysis System version 9.0 (SAS, 2002) for a balanced analysis of variance (ANOVA), and the means were separated using Tukey's test ($p = 0.05$).

crecimiento radial del patógeno (CRP), crecimiento radial del antagonista (CRA) y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Se evaluó el PICR de acuerdo con Ezziyyani *et al.* (2004) usando la fórmula $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el crecimiento radial del patógeno testigo y R2 es el crecimiento radial del patógeno en la confrontación, mientras que el tipo de antagonismo fue medido de acuerdo con la escala de Bell (Bell *et al.*, 1982).

Análisis estadístico

Ambos ensayos se realizaron por triplicado, con diez cajas de Petri por repetición para cada evaluación *in vitro* de bacteria-hongo, usando un diseño completamente al azar con los siguientes seis tratamientos: cuatro aislados de hongos antagonistas y dos aislados de bacterias antagonistas confrontadas contra siete aislados de Oomicetos, con un testigo para cada microorganismo, mientras que cada tratamiento constó de un microorganismo antagonista con 30 cajas de Petri. Los datos del PICR y el halo de inhibición se analizaron usando el Sistema de Análisis Estadístico versión 9.0 (SAS, 2002) para un análisis de varianza (ANVA), y las medias fueron separadas usando la prueba de Tukey ($p = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia de daño infeccioso en raíces

La incidencia total de enfermedades de raíz en los huertos muestreados fue de 17%. Dicha incidencia osciló de 1 a 32% y de 4 a 28% en huertos de Cuauhtémoc y Namiquipa, respectivamente, con una incidencia promedio de 16% para ambas áreas. En Guerrero y Bachíniva, la incidencia fluctuó de 12 a 24% y de 2 a 40%, respectivamente,

RESULTS AND DISCUSSION

Incidence of roots infection damage

The total incidence of root disease in sampled orchards was 17%. This incidence ranged from 1 to 32% and from 4 to 28% in the orchards from Cuauhtémoc and Namiquipa respectively, with an average incidence of 16% for both areas. In Guerrero and Bachíniva, the incidence ranged from 12 to 24% and from 2 to 40%, respectively, with an average incidence of 17% for both areas (Table 1). The highest incidence was observed in “San Joaquin” and “La Ciénega” orchards, located in Bachíniva, probably as a consequence of the advanced age of the trees (44 and 34 years old, respectively) and the medium level of technification making them more susceptible to the attack of the phytopathogens. The climate conditions of this region, which were better for the growth of the microorganisms might also be involved in this high incidence of infection damage of roots.

The incidence values probably depended of the technification level (mainly the irrigation method), climate conditions, soil type, unrecognized interactions among phytopathogens, rootstocks, differences in horticultural practices and age of the trees in each orchard. It is also important to consider that in some orchards, farmers apply organic matter to the soil, which could favor the establishment of antagonistic microorganisms, improving their development and thus avoiding the growth of phytopathogens (Kamal *et al.*, 2010). The variability of incidence values for each orchard and locality might be consequence of the pathogenicity and virulence of the microorganism (Wilcox, 1993). Manici *et al.* (2013) also observed that the incidence of root diseases varied considerably among regions and the severity of the disease was attributed to the fungi composing the microorganism complex.

con una incidencia promedio de 17% para ambas áreas (Cuadro 1). La incidencia más alta se observó en los huertos “San Joaquín” y “La Ciénega”, localizados en Bachíniva, probablemente como consecuencia de la avanzada edad de los árboles (44 y 34 años, respectivamente) y el nivel medio de tecnificación, haciéndolos más susceptibles al ataque de los fitopatógenos. Las condiciones climáticas de ésta región, las cuales son mejores para el crecimiento de los microorganismos, también pueden estar involucradas en esta alta incidencia de daño infeccioso de raíces.

Los valores de incidencia probablemente dependen del nivel de tecnificación (principalmente el método de riego), las condiciones climáticas, el tipo de suelo, las interacciones sin reconocer entre patógenos, el portainjerto, las diferencias en las prácticas hortícolas y la edad de los árboles en cada huerto. Además, es importante considerar que en algunos huertos, los agricultores aplican materia orgánica al suelo, lo que puede favorecer el establecimiento de microorganismos antagonistas, mejorando su desarrollo y, por lo tanto, evitando el crecimiento de fitopatógenos (Kamal *et al.*, 2010). La variabilidad de los valores de incidencia para cada huerto y localidad, pueden ser consecuencia de la patogenicidad y virulencia de los microorganismos (Wilcox, 1993). Manici *et al.* (2013) también observaron que la incidencia de enfermedades de raíces varió considerablemente entre regiones y la severidad de las enfermedades se atribuyó a la composición del complejo de hongos.

Las enfermedades de pudrición de corona y raíz en huertos de manzano son problemas importantes alrededor del mundo. Manici *et al.* (2013) observaron una alta incidencia de infecciones causadas por *Pythium* spp. y las infecciones causadas por especies de *Fusarium* fueron altamente asociadas a enfermedades de replante. Este problema también se observó en el presente estudio para los portainjertos de

The crown and root rot diseases in apple orchards are important problems worldwide. Manici *et al.* (2013) observed a high incidence of infections caused by *Pythium* spp. and that infections caused by *Fusarium* species were highly associated to replanting diseases. This problem was also observed in the present study for 1-year-old apple rootstocks (MM.111) in “El Picacho Lot 7” orchard from Cuauhtémoc, with a high technification level. According to Ramírez-Legarreta *et al.* (2004), the level of technification (medium and high) in apple orchards directly affect the disease incidence primarily through micro-sprinkler type or rolled irrigation but heating type, use of hail mesh, use of inputs and ongoing or casual technical assistance are also involved, among other factors. However, most of the orchards sampled in the present study with a medium technification level showed the presence of *P. cactorum* and *Pythium* spp. and particularly the fungus *F. oxysporum*, which, in some cases, could be attributed to the type of orchard management being a potential determining factor in the incidence of pathogens, including the causal agents of crown and root rot diseases. Importantly, the orchards with a high level of technification have permanent technical assistance, which helps in the early detection of diseases for their prevention and management.

Morphological and molecular identification of the microorganisms

Microorganisms associated with root disease symptoms in apple trees were the Oomycetes *Phytophthora* spp. and *Pythium* spp. and the fungi *Fusarium* spp., *Gibberella* spp. (*Fusarium* spp. teleomorph), *Bionectria ochroleuca*, *Clonostachys* sp., *Alternaria* spp., and *Phymatotrichopsis* sp. These microorganisms were identified according to their morphological characters and genomic

manzano de 1 año de edad (MM.111) en “El Picacho Lot 7” huerto de Cuauhtémoc, con un alto nivel de tecnificación. De acuerdo con Ramírez-Legarreta *et al.* (2004), el nivel de tecnificación (medio y alto) en huertos de manzano, afectan directamente la incidencia de enfermedades, principalmente mediante el tipo de micro aspersión o riego rodado, pero también del tipo de calefacción, uso de malla anti-granizo, uso de insumos y asistencia técnica continua u ocasional, también están involucradas, entre otros factores. Sin embargo, la mayoría de los huertos muestreados en el presente estudio, con un nivel medio de tecnificación, mostraron la presencia de *P. cactorum* y *Pythium* spp. y particularmente el hongo *F. oxysporum*, lo cual, en algunos casos, se puede atribuir al tipo de manejo del huerto, siendo un factor determinante potencial en la incidencia de los patógenos, incluyendo los agentes causales de enfermedades de cuello y raíz. Es importante destacar que los huertos con un alto nivel de tecnificación, cuentan con asistencia técnica permanente, la cual ayuda en la detección temprana de enfermedades para su prevención y manejo.

Identificación morfológica y molecular de microorganismos

Los microorganismos asociados con los síntomas de enfermedades de raíz en huertos de manzano fueron los Oomicetos *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. y los hongos *Fusarium* spp, *Gibberella* spp. (teleomórfo de *Fusarium* spp.), *Bionectria ochroleuca*, *Clonostachys* sp., *Alternaria* spp., y *Phymatotrichopsis* sp. Estos microorganismos fueron identificados de acuerdo con sus caracteres morfológicos y secuencias genómicas. El género *Fusarium* spp., fue el más frecuentemente observado (67.3%, 202 aislados), con 32.3% (97 aislados) de este género, pertenecientes a *F. oxysporum*. Las especies restantes de éste género fueron *F. solani*,

sequences. The genus *Fusarium* spp. was the most frequently observed (67.3%, 202 isolates), with 32.3% (97 isolates) of this genus belonging to *F. oxysporum*. The remainder species of this genus were *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. sacchari*, *F. succisae*, *F. tricinctum*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* and *F. equiseti*. This distribution of species of the genus *Fusarium* is similar to that found in other geographic locations worldwide (Serdani *et al.*, 2002; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Leslie *et al.* (2007) found that *F. succisae* is phylogenetically closely related to *F. proliferatum*, which has been associated with apple seedlings in China (Ju *et al.*, 2014). Both *F. fujikuroi* and *F. sacchari* were associated with rice, sugarcane and corn plots from Peninsular Malaysia (Hsuan *et al.*, 2011), while *F. equiseti* was associated with apple tree rhizosphere in Chihuahua, Mexico (Pérez-Corral *et al.*, 2015). In addition, Carreri *et al.* (2013) isolated *F. tricinctum* from onion roots and bulbs in southern Italy. However, an association between the *Fusarium* species and apple tree rhizosphere has not been reported. Thus, *F. fujikuroi*, *F. sacchari*, *F. tricinctum* and *F. subglutinans* are considered for the first time as pathogenic for apple roots.

The second most frequently observed genus was *Fusarium* teleomorph (*Gibberella* spp.), with 15% (45 isolates belonging *G. moniliformis* anamorph: *Fusarium verticillioides* and *G. intermedia* anamorph: *Fusarium proliferatum*), followed by *Bionectria ochroleuca* (12%, 36 isolates), *Alternaria* spp. (17%, 5 isolates) comprising mainly *A. brassicae* and *A. alternata*, *Clonostachys* sp. (1.3%, 4 isolates), *Phytophthora cactorum* (1.3%, 4 isolates), *Pythium* spp. (0.7%, 3 isolates), *Phymatotrichopsis* sp. (0.3%, 1 isolate) (Table 2). Scherm *et al.* (2013) demonstrated that the teleomorph of *Fusarium* species (*Gibberella* spp.) can be found in other crops. In addition, the Oomycetes *P. cactorum* and *Pythium* spp. found

F. subglutinans, *F. sacchari*, *F. succisae*, *F. tricinctum*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* y *F. equiseti*. Ésta distribución de especies del género *Fusarium* es similar a lo encontrado en otras regiones geográficas alrededor del mundo (Serdani *et al.*, 2002; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Leslie *et al.* (2007) encontraron que *F. succisae* está filogenéticamente relacionado con *F. proliferatum*, la cual ha sido asociada con plántulas de manzano en China (Ju *et al.*, 2014). Tanto *F. fujikuroi* y *F. sacchari*, fueron asociadas con arroz, caña de azúcar y parcelas de maíz de la Península de Malasia (Ju *et al.*, 2014), mientras que *F. equiseti* ha sido asociada con la rizosfera de árboles de manzano en Chihuahua, México (Pérez-Corral *et al.*, 2015). Además, Carreri *et al.* (2013) aislaron *F. tricinctum* de raíces y bulbos de cebolla en el sur de Italia. Sin embargo, no se ha reportado una asociación entre las especies de *Fusarium* y la rizosfera de árboles de manzano. Por lo tanto, se considera que es la primera vez que se reportan a *F. fujikuroi*, *F. sacchari*, *F. tricinctum* and *F. subglutinans* como patógenicos para las raíces de manzano.

El segundo género más frecuentemente observado fue el teleomórfo de *Fusarium* (*Gibberella* spp.), con 15% (45 aislados pertenecientes a *G. moniliformis* anamórfo: *Fusarium verticillioides* y *G. intermedia* anamórfo: *Fusarium proliferatum*), seguidos por *Bionectria ochroleuca* (12%, 36 aislados), *Alternaria* spp. (17%, 5 aislados) que comprenden principalmente *A. brassicae* y *A. alternata*. *Clonostachys* sp. (1.3%, 4 aislados), *Phytophthora cactorum* (1.3%, 4 aislados), *Pythium* spp. (0.7%, 3 aislados), *Phymatotrichopsis* sp. (0.3%, 1 aislado) (Cuadro 2). Scherm *et al.* (2013) demostraron que el teleomórfo de las especies de *Fusarium* (*Gibberella* spp.), puede ser encontrado en otros cultivos. Además, los Oomicetos *P. cactorum* y *Pythium* spp. encontrados en este estudio, fueron distribuidos diferencialmente entre los huertos.

in this study were differentially distributed among the orchards. These species have been reported as the main causal agents of crown, collar and root rot in apples in other countries (Roiger and Jeffers, 1991; Yao *et al.*, 2006). Other species, such as *B. ochroleuca*, *A. alternata* and *A. brassicae*, have also been associated with core rot in apple trees in South Africa (Serdani *et al.*, 2002). Moreover, *P. omnivora*, the causal agent of Texas root rot, has been reported as a pathogen that causes important economic losses in different crops in northern Mexico and southern USA, particularly in cotton and walnut trees, reflecting its adaptability to a wide range of climatic conditions (Samaniego-Gaxiola, 2007) and being a potential causal agent of root diseases in other fruit trees. The present study reports for the first time the fungus *Phymatotrichopsis* sp. as a pathogenic agent for roots in apple orchards from Mexico. In addition, four *Trichoderma* species were obtained from soil samples, being *Trichoderma gamsii* the most frequently observed antagonist, with 72.5%, followed by *T. hamatum*, *T. harzianum* and *T. atroviride* with 15, 7.5, and 5%, respectively (Table 2).

Pathogenicity tests

The susceptibility of the rootstocks to tested fungi and Oomycetes is shown in Table 3. All rootstocks were susceptible to at least two of the isolates, except G.935, which was resistant to the tested isolates of fungi and Oomycetes. The G.30, G.202 and G.41 rootstocks were the most susceptible to 13, 10 and 9 of the tested pathogens, respectively. *Pythium ultimum* was the most pathogenic, causing diseases in 100% of the tested trees (Table 3). Although the G.30 and MM.111 were highly susceptible rootstocks (more than 50-75%), they are widely planted in the apple producing areas of Chihuahua, Mexico.

Cuadro 2. Aislados de hongos y Oomicetos y posibles hongos antagonistas, identificados molecularmente, asociados a árboles de manzano con aparente enfermedad de raíz y libres de síntomas de cuatro localidades en el estado de Chihuahua, México, y su ocurrencia (%).**Table 2. Fungi and Oomycetes isolates and putative fungal antagonists, molecularly identified, associated to apparently root diseased and diseased symptom-free apple trees from four localities in the state of Chihuahua, Mexico, and their occurrence rate (%).**

| Fitopatógenos y Antagonistas | Cuauhtémoc | | Namiquipa | | Guerrero | | Bachíniva | | Total (%) |
|--------------------------------|---|--|---|----------------|----------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-----------|
| | Huerto | Portainjerto | Huerto | Portainjerto | Huerto | Portainjerto | Huerto | Portainjerto | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Picacho (lot 7, lot 6), Campo 2A, Campana (Campo 4) | MM.111, Bud 108, M.7, Standard (15.0) | Reyes Nevarez 1, Carlos Márquez, Reyes Nevarez 3, Manuel Rivera | Standard (4.4) | Las Margaritas | MM.111 (6.4) | San Joaquin, La Ciénega | Standard (6.8) | 32.6 |
| <i>Bionectria ochroleuca</i> | Campana (Campo 4), Picacho lot 1A, Campo 2A | Standard, MM. 106, Bud 108, M.7 (10.0) | Reyes Nevarez 1, Reyes Nevarez 3 | Standard (1.0) | — | — | Bety | Standard (1.0) | 12.0 |
| <i>Fusarium solani</i> | Campana (Campo 4), Picacho lot 7, Campo 2A | Standard, MM. 111, Bud 108, M.7 (8.0) | Reyes Nevarez 3 | Standard (0.5) | — | — | Rosy | Standard (0.7) | 9.2 |
| <i>Gibberella moniliformis</i> | Campana (Campo 4), Picacho lot 1A, Campo 2A | Standard, MM. 106, Bud 108, M.7 (7.0) | Reyes Nevarez 1, Carlos Márquez | Standard (1.4) | El Tanque | Standard (0.3) | — | — | 8.7 |
| <i>Fusarium subglutinans</i> | Campana (Campo 4), Picacho (lot 6, lot 7, lot 1A) | Standard, MM.111, MM. 106 (7.0) | Carlos Márquez, Reyes Nevarez 3 | Standard (1.4) | — | — | — | — | 8.4 |
| <i>Fusarium sacchari</i> | Campana (Campo 4), | Standard (4.0) | — | — | — | — | San Joaquin, Bety | Standard, MM. 111 (3.1) | 7.1 |
| <i>Gibberella intermedia</i> | Campana (Campo 4), Campo 2A | Standard, Bud 108, M.7 (5.0) | — | — | — | — | La Ciénega, San Joaquín | Standard (1.4) | 6.4 |
| <i>Fusarium succisae</i> | Picacho lot 7, Campo 2A | MM. 111, Bud 108, M.7 (4.1) | Carlos Márquez | Standard (1.0) | — | — | — | — | 5.1 |
| <i>Fusarium tricinctum</i> | Campana (Campo 4), Picacho lot 7, Campo 2A | Standard, MM. 111, Bud 108, M.7 (1.3) | — | — | — | — | La Ciénega | Standard (0.7) | 2.0 |
| <i>Fusarium</i> sp. | Picacho lot 1A | MM. 106 (1.1) | — | — | Las Margaritas | MM. 111 (0.7) | — | — | 1.8 |
| <i>Clonostachys</i> sp. | Picacho lot 1A | MM. 106 (1.3) | — | — | — | — | — | — | 1.3 |

Cuadro 2. Continúa.

| Fitopatógenos y Antagonistas | Cuauhtémoc | | Namiqiipa | | Guerrero | | Bachíniva | | Total (%) |
|--|---|-------------------------------------|-----------------|----------------|-------------------------|-----------------|--------------|---------------|------------|
| | Huerto | Portainjerto | Huerto | Portainjerto | Huerto | Portainjerto | Huerto | Portainjerto | |
| <i>Phytophthora cactorum</i> ^x | Picacho lot 7 | MM. 111 (1.0) | Reyes Nevarez 3 | Standard (0.3) | — | — | — | — | 1.3 |
| <i>Pythium</i> spp. | Picacho lot 7 | MM. 111 (0.7) | — | — | Las Margaritas | MM. 111 (0.3) | — | — | 1.0 |
| <i>Fusarium fujikuroi</i> | Picacho lot 1A, Campana (Campo 4) | Standard, MM. 106 (0.7) | — | — | — | — | — | — | 0.7 |
| <i>Fusarium proliferatum</i> | Picacho lot 1A, Campana (Campo 4) | Standard, MM.106 (0.7) | — | — | — | — | — | — | 0.7 |
| <i>Alternaria brassicae</i> | Picacho lot 1A | MM.111 (0.7) | — | — | — | — | — | — | 0.7 |
| <i>Alternaria</i> sp. | — | — | — | — | Tres Compadres | Standard (0.3) | — | — | 0.3 |
| <i>Alternaria alternata</i> | — | — | — | — | Gameros | Standard (0.3) | — | — | 0.3 |
| <i>Fusarium equiseti</i> | Picacho lot 7 | MM. 111 (0.2) | — | — | — | — | — | — | 0.2 |
| <i>Phymatotrichopsis</i> sp. ^x | Picacho lot 7 | MM. 111 (0.2) | — | — | — | — | — | — | 0.2 |
| Total | | 68 | | 10 | | 8 | | 14 | 100 |
| <i>Trichoderma gamsii</i> ^y | Picacho lot 1A, Picacho lot 7, Campo 2A | MM.111, MM.106, Bud 108, M.7 (65.0) | Reyes Nevarez 2 | Standard (5.0) | — | — | Manuel, Bety | MM. 111 (2.5) | 72.5 |
| <i>Trichoderma hamatum</i> ^y | — | — | Reyes Nevarez 2 | Standard (2.5) | Gameros, Tres Compadres | Standard (12.5) | — | — | 15.0 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> ^y | Picacho lot 6 | MM. 111 (5.0) | — | — | — | — | Bety, Rosy | MM. 111 (2.5) | 7.5 |
| <i>Trichoderma atroviride</i> ^y | Campo 2A | Bud 108, M.7 (5.0) | — | — | — | — | — | — | 5.0 |
| Total | | 75 | | 7.5 | | 12.5 | | 5 | 100 |

^x Aislados de Oomicetos y hongos identificados de acuerdo con sus caracteres morfológicos / ^x Oomycete and fungal isolates identified according to their morphological characters.

^y Posibles hongos antagonistas / ^y Putative antagonistic fungi.

Estas especies han sido reportadas como los principales agentes causales de pudriciones de cuello, corona y raíz en manzanos en otros países (Roiger y Jeffers, 1991; Yao *et al.*, 2006). Otras especies tales como *B. ochroleuca*, *A. alternata* y *A. brassicae*, también han sido asociadas con pudriciones en árboles de manzano en Sudáfrica (Serdani *et al.*, 2002). Por otra parte, *P. omnivora*, el agente causal de la pudrición texana de la raíz, ha sido reportado como patógeno que causa pérdidas económicas importantes en diferentes cultivos en el norte de México y el sur de Estados Unidos de América, particularmente en algodón y nogales, reflejando su adaptabilidad a una amplia gama de condiciones climáticas (Samaniego-Gaxiola, 2007), y siendo un potencial agente causal de enfermedades de raíz en otros árboles frutales. El presente estudio reporta por primera vez el hongo *Phymatotrichopsis* sp., como agente patógeno de raíces en huertos de manzano de México. Además se obtuvieron cuatro especies de *Trichoderma* de muestras de suelo, siendo *Trichoderma gamsii* el antagonista más frecuentemente observado con 72.5%, seguido por *T. hamatum*, *T. harzianum* y *T. atroviride* con 15, 7.5 y 5%, respectivamente (Cuadro 2).

Pruebas de patogenicidad

En el Cuadro 3, se muestra la susceptibilidad de los portainjertos a hongos y Oomicetos. Todos los portainjertos fueron susceptibles al menos a dos de los aislados, excepto G.935, el cual fue resistente a los aislados de hongos y Oomicetos probados. Los portainjertos G.30, G.202 y G.41 fueron los más susceptibles a 13, 10 y 9 de los patógenos evaluados, respectivamente. *Pythium ultimum* fue el más patogénico, causando enfermedades en el 100% de los árboles probados (Cuadro 3). Aunque los portainjertos G.30 y MM.111 fueron altamente susceptibles (más de 50-75%), son ampliamente

These rootstocks showed symptoms of infection with five Oomycete isolates, with *P. cactorum* C1 and *Pythium ultimum* isolates being the most pathogenic. These rootstocks along with MM.106 have been reported as the most susceptible to these pathogens (Roiger and Jeffers, 1991; Uthkede and Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). Similar results were found by Latorre *et al.* (2001) after inoculation of *Phytophthora* isolates, with *P. cactorum* resulting the most virulent and pathogenic to M.9, M.25, MM.106 and MM.111 apple rootstocks. The Standard rootstock was only susceptible to two *Pythium* species, *P. irregulare* and *P. ultimum* with 80 and 60%, respectively (Table 3). This finding is contrary to that was observed in tested orchards, where the highest incidence of infection damage of roots was found on Standard rootstocks. However, this could be related to the age of the trees (30-40 years old), making them more susceptible to the attack of phytopathogens. Most of tested rootstocks were susceptible to *P. cactorum* and *Pythium* spp. isolates, as previously demonstrated by others (Yao *et al.*, 2006). Roiger and Jeffers (1991) found that *P. cactorum* was highly responsible for crown and root rot in apple trees worldwide. However, Tewoldemedhin *et al.* (2011a-b) reported that the etiological agent of root diseases is a complex of multiple fungal and Oomycete species belonging to the genera *Phytophthora*, *Pythium*, and *Rhizoctonia* (Manici *et al.*, 2013). In the present study, *P. cactorum*, *P. ultimum*, *F. sacchari* and *F. oxysporum* were the most pathogenic species. These species have previously been reported in other studies as causal agents of root rot diseases in apple trees of major importance worldwide (Uthkede and Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001).

The most pathogenic *Fusarium* isolate was *F. sacchari*, which infected 100% of the M.25, Bud.9 and G.30 trees in spite of the fact that this isolate had low consistency (7.1%) as compared to the rest

Cuadro 3. Porcentaje de patogenicidad de aislados de Oomicetos y hongos al ser evaluados bajo condiciones de invernadero contra doce portainjertos de 1 año de edad predominantemente plantados en el estado de Chihuahua, México, después de dos meses de ser inoculados.

Table 3. Pathogenicity percentage of Oomycetes and fungi isolates when tested under greenhouse conditions against twelve 1-year-old rootstocks predominantly planted in the state of Chihuahua, Mexico, after two months of being inoculated.

| Hongos y Oomicetos | Portainjerto | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------|-------|-------|------|---------|-------|------|-------|-------|------|-----|----------|
| | G.222 | M.111 | G.935 | M.25 | Bud 118 | Bud 9 | G.30 | M.106 | G.202 | G.41 | M.7 | Standard |
| <i>Pythium irregulare</i> | 80 | - | - | - | - | - | 60 | - | - | - | - | 80 |
| <i>Pythium ultimum</i> | - | 100 | - | 60 | - | 80 | 100 | 80 | 100 | 80 | 80 | 60 |
| <i>Pythium</i> sp. | - | 80 | - | - | 80 | 60 | 60 | - | 80 | 100 | 60 | - |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c1 | - | 100 | - | 60 | 100 | - | 100 | - | - | - | - | - |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c2 | - | 80 | - | - | 80 | - | 80 | - | - | 80 | - | - |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c3 | - | - | - | - | 100 | 60 | 100 | 100 | 100 | - | - | - |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c4 | - | 60 | - | - | - | 80 | 80 | - | 100 | 80 | - | - |
| <i>Alternaria alternata</i> | - | - | - | - | 60 | 80 | 80 | 60 | 100 | 80 | - | - |
| <i>Alternaria brassicae</i> | - | - | - | - | - | 60 | 80 | 60 | - | - | - | - |
| <i>Fusarium sacchari</i> | 60 | - | - | 100 | - | 100 | 100 | 60 | 60 | 60 | - | - |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 60 | 60 | - | 60 | - | - | 60 | - | - | 60 | 100 | - |
| <i>Fusarium tricinctum</i> | 60 | - | - | - | - | 60 | - | - | 60 | - | - | - |
| <i>Fusarium solani</i> | 80 | - | - | - | - | - | 60 | - | 60 | 60 | - | - |
| <i>Gibberella intermedia</i> | - | 60 | - | - | - | - | 60 | - | 60 | 60 | - | - |
| <i>Bionectria ochroleuca</i> | 60 | 60 | - | - | 60 | - | 100 | - | 100 | - | 60 | - |
| Control | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Solo se consideraron patogénicos a los aislados de Oomicetos y hongos que causaron síntomas en $\geq 60\%$ de cada uno de los portainjertos, después de dos meses de haber sido inoculados / Only Oomycetes and fungal isolates that caused $\geq 60\%$ symptoms in each rootstock, after two months of being inoculated, were considered pathogenic.

(-) Sin síntomas / (-) Without symptoms.

plantados en las áreas productoras de manzana de Chihuahua, México. Estos portainjertos mostraron síntomas de infección a cinco aislados de Oomicetos, siendo *P. cactorum* C1 y *Pythium ultimum* los aislados más patogénicos. Estos portainjertos junto con MM.106 han sido reportados como los más susceptibles a estos patógenos (Roiger y Jeffers, 1991; Uthkede y Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). Resultados similares fueron encontrados por Latorre *et al.* (2001) después de la inoculación de aislados de *Phytophthora*, siendo *P. cactorum* el más virulento y patogénico a los portainjertos M.9, M.25, MM.106 and MM.111. El portainjerto Estándar únicamente fue susceptible a dos especies de *Pythium*, *P. irregulare* y *P. ultimum* con 80 y

of the identified microorganisms. This effect of *F. sacchari* might be consequence of its low growth rate or to the presence of some antagonistic isolates coexisting in the same microenvironment (Table 3). In contrast, *F. tricinctum* and *F. solani* resulted non-pathogenic in seven rootstocks while in the rest of the *Fusarium* isolates showed low pathogenicity. Manici *et al.* (2003) also observed non-pathogenic of *Fusarium* isolates in apple trees.

Alternaria alternata was the most pathogenic in G.202 rootstock. Control rootstocks remained free of diseased during the experiment. The main symptoms observed were malformations, gradual wilting in diseased rootstocks, defoliation, senescence, necrotic tissues, chlorosis, rigid leaves,

60%, respectivamente (Cuadro 3). Éste hallazgo es contrario a lo que se observó en los huertos evaluados, donde la más alta incidencia de daño infeccioso en raíces fue encontrado en portainjertos Estándar. Sin embargo, esto puede estar relacionado a la edad de los árboles (30-40 años), haciéndolos más susceptibles al ataque de fitopatógenos. La mayoría de los portainjertos probados fueron susceptibles a aislados de *P. cactorum* y *Pythium* spp., como fue demostrado previamente por otros (Yao *et al.*, 2006). Roiger y Jeffers (1991) encontraron que *P. cactorum* fue altamente responsable de la pudrición de corona y raíz en árboles de manzano alrededor del mundo. Sin embargo, Tewoldemedhin *et al.* (2011a-b) reportaron que el agente etiológico de las enfermedades de raíz es un complejo múltiple de especies de hongos y Oomicetos pertenecientes a los géneros *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia* (Manici *et al.*, 2013). En el presente estudio, *P. cactorum*, *P. ultimum*, *F. sacchari* y *F. oxysporum* fueron las especies más patogénicas. Estas especies han sido previamente reportadas en otros estudios como agentes causales de enfermedades de pudrición de raíz en árboles de manzano de mayor importancia alrededor del mundo (Uthkede y Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001).

El aislado más patogénico de *Fusarium* fue *F. sacchari*, el cual infectó 100% de los árboles M.25, Bud.9 y G.30, a pesar de que este aislado tuvo una baja consistencia (7.1%) en comparación con el resto de los microorganismos identificados. Este efecto de *F. sacchari* puede ser consecuencia de su baja tasa de crecimiento o a la presencia de algunos aislados antagonistas coexistiendo en el mismo microambiente (Cuadro 3). En contraste, *F. tricinctum* y *F. solani*, resultó ser no-patogénico en siete portainjertos mientras el resto de los aislados de *Fusarium* mostró una baja patogenicidad. Manici *et al.* (2003) también observaron aislados no-patogénicos en árboles de manzano.

leaves with dark brown round spots with concentric yellowish rings, young shots withered, root and neck rot, collapsed stems with black and oval spots, canker, discoloration of brown to reddish-brown and gummy exudates.

Antagonistic activity *in vitro* of *Trichoderma* spp. vs Oomycetes

The four species of *Trichoderma* showed similar antagonistic behavior when they were confronted against *Pythium* spp. and *P. cactorum* isolates. However, the PIRG was different for isolates of *Pythium* spp. (1.6-31.4%, $p=0.05$) and *P. cactorum* (8.1-92.1%, $p=0.05$). The overgrowth (total invasion over the pathogens) of the four species of *Trichoderma* was observed for all isolates of both Oomycetes after eight days post-confrontation (Table 4). Gajera and Vakharia (2010) also observed the highest growth inhibition of phytopathogenic fungi with some *Trichoderma* species. Gajera and Vakharia (2010) demonstrated that these species competed against phytopathogenic fungi and produced extracellular enzymes (i.e. chitinase, β -1,3 glucanase, and proteases), besides of being antifungal, growth promoters, and induced the resistance of plants to pathogens. Among testes *Trichoderma* species, *T. asperellum* showed a low PIRG (15.5-31.4%, $p=0.05$) in the three species of *Pythium*, with the highest inhibition being observed with *P. irregulare* at the fifth day post-confrontation. In confrontations with *P. cactorum* isolates, the PIRG was >84% ($p=0.05$) at the eighth day post-confrontation (Table 4; Fig. 1a). Similarly, Rios-Velasco *et al.* (2016) also observed significant inhibition of radial growth in confrontations of *T. asperellum* against *Aspergillus nidulans* and *Penicillium crustosum*, showing the potential of this strain to be used as biological control agent of different types of phytopathogens.

Alternaria alternata fue el más patogénico en portainjertos G.202. Los portainjertos testigo se mantuvieron libres de enfermedades durante el experimento. Los principales síntomas observados fueron malformaciones, marchitez gradual en los portainjertos enfermos, defoliación, senescencia, tejido necrótico, clorosis, hojas rígidas, hojas con manchas redondas café oscuro con anillos concéntricos amarillos, brotes jóvenes marchitos, pudrición de cuello y raíz, tallos colapsados con manchas ovales negras, cánceres, decoloración de marrón a marrón rojizo y exudados gomosos.

Actividad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. vs Oomicetos

Las cuatro especies de *Trichoderma* mostraron un comportamiento antagónico similar cuando fueron confrontados contra aislados de *Pythium* spp. y *P. cactorum*. Sin embargo, el PICR fue diferente para aislados de *Pythium* spp. (1.6-31.4%, $p=0.05$) y *P. cactorum* (8.1-92.1%, $p=0.05$). Se observó sobrecrecimiento (invasión total sobre los patógenos) de las cuatro especies de *Trichoderma* para todos los aislados de ambos Oomicetos después de ocho días post-confrontación (Cuadro 4). Gajera y Vakharia (2010) también observaron la más alta inhibición de crecimiento de los hongos fitopatógenos con algunas especies de *Trichoderma*. Gajera y Vakharia (2010) demostraron que dichas especies compiten contra hongos fitopatógenos y producen enzimas extracelulares (ej. quitinasa, β -1,3 glucanasa, y proteasas), además de ser antifúngicos, promotores del crecimiento, e inducen la resistencia de las plantas a patógenos. Entre las especies de *Trichoderma* probadas, *T. asperellum* mostró un bajo PICR (15.5-31.4%, $p=0.05$) en las tres especies de *Pythium*, con la inhibición más alta observada con *P. irregulare* al quinto día post-confrontación. En las confrontaciones con aislados de *P. cactorum* el

In our study, *T. harzianum* showed the same trend in PIRG as compared with *T. asperellum*; when it was confronted against *Pythium* spp., the incidence ranged from 1.6 to 7.9% ($p=0.05$) but in confrontations with *P. cactorum* isolates, the incidence ranged from 86.6 to 92.1% ($p=0.05$) (Table 4; Figure 1b). This difference could be attributed to the ability of *T. harzianum* to produce the antibiotic 6-pentyl- α -pyrone and regulate genes involved in the biosynthesis of trichothecenes and mycotoxins with broad spectrum of antimicrobial activities (Cooney *et al.*, 2001). Additionally, this antagonist completely filled the Petri dish after three days.

Trichoderma gamsii showed values of PIRG from 15.5 to 29.7% ($p=0.05$) in *Pythium* spp. isolates and >81% in *P. cactorum* isolates. These results were similar to those obtained with *T. asperellum* (Table 4). Moreover, *T. atroviride* showed the same trend, with a PIRG values from 11.8 to 26.3% ($p=0.05$) in *Pythium* spp. isolates and >89% ($p=0.05$) in *P. cactorum* isolates at the fifth and sixth day post-confrontation, respectively (Table 4; Figure 1c). In this study, *T. atroviride* was the best control agent for the inhibition of the growth of *P. cactorum* in PDA medium. Gajera and Vakharia (2010) also observed that *T. atroviride* was effective to reduce the incidence of collar rot, reducing pathogen virulence. Roiger and Jeffers (1991) suggested that *Trichoderma* species are promissory as biological control agents to *P. cactorum*, because its use is compatible with management practices and other root diseases, including the use of pesticides. *Trichoderma* species also showed plant growth promoter activities, suggesting another potential benefit for their use. According to Bell's scale, an antagonism Type 1 was found for the four *Trichoderma* species, where the antagonist (*Trichoderma* spp.) overgrew completely on pathogen's colony and completely

Cuadro 4. Inhibición de crecimiento de Oomicetos, cuando se confrontaron *in vitro* contra especies de *Trichoderma* a los 8 d post-inoculación y por especies de *Bacillus* al sexto día post-inoculación.**Table 4. Growth inhibition of Oomycetes, when confronted *in vitro* against *Trichoderma* species 8 d post-inoculation and by *Bacillus* species at sixth day post-inoculation.**

| Oomicetos
fitopatógenos | Inhibición del patógeno (%) ± DE | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------|------------------|-------------------|---------------|
| | <i>Bacillus</i> | | <i>Trichoderma</i> | | | |
| | <i>methylophilicus</i> | <i>amyloliquefaciens</i> | <i>asperellum</i> | <i>harzianum</i> | <i>atroviride</i> | <i>gamsii</i> |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c1 | 91.6±0.2a ^x | 93.8±0.3a | 84.2±0.4b | 88.3±0.7ab | 91.4±0.9a | 81.4±0.7b |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c2 | 92.3±0.3a | 92.8±0.2a | 84.1±1.0b | 86.7±0.9b | 89.0±0.5b | 81.4±0.9b |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c3 | 85.8±0.1b | 85.1±0.1b | 88.0±0.6a | 92.1±0.7a | 92.1±0.5a | 86.4±0.6a |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c4 | 88.2±0.7ab | 91.4±0.6a | 84.8±1.0b | 90.0±0.4a | 91.1±1.0a | 83.5±0.9ab |
| <i>Pythium irregulare</i> | 18.8±0.3c | 47.3±1.6c | 31.4±6.0c | 7.9±3.5b | 13.5±0.4d | 29.7±5.7c |
| <i>Pythium ultimum</i> | 1.4±0.2d | 2.4±0.4e | 15.5±1.8d | 1.6±0.7d | 11.8±0.9d | 15.5±1.8e |
| <i>Pythium</i> sp. | 14.9±0.2c | 11.2±0.4d | 26.5±4.9cd | 3.3±1.5c | 26.3±0.9c | 23.4±5.0d |

^xLas letras en la misma columna indican diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra no son diferentes significativamente (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ($p=0.05$) / ^xLetters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ($p=0.05$).

PICR fue >84% ($p=0.05$) al octavo día post-confrontación (Cuadro 4; Figura 1a). De manera similar, Rios-Velasco *et al.* (2016) también observaron inhibiciones del crecimiento radial significativas en confrontaciones de *T. asperellum* contra *Aspergillus nidulans* y *Penicillium crustosum*, mostrando el potencial de estas cepas para ser utilizadas como agentes de control biológico de diferentes tipos de fitopatógenos. En nuestro estudio, *T. harzianum* mostró la misma tendencia en PICR al ser comparada con *T. asperellum*; cuando fue confrontada contra *Pythium* spp., la incidencia fluctuó entre 1.6 y 7.9% ($p=0.05$) pero en confrontaciones con aislados de *P. cactorum*, la incidencia osciló de 86.6 a 92.1% ($p=0.05$) (Cuadro 4; Figura 1b). Esta diferencia se puede atribuir a la habilidad de *T. harzianum* para producir el antibiótico 6-pentil- α -pirona y regular los genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos y micotoxinas con actividades antimicrobianas de amplio espectro (Cooney *et al.*, 2001). Adicionalmente, este antagonista llenó completamente la caja de Petri después de tres días.

Trichoderma gamsii mostró valores de PICR de 15.5 a 29.7% ($p=0.05$) en aislados de *Pythium* spp.

covered medium's surface after six days post-inoculation against *Phytophthora* isolates.

Antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. vs Oomycetes

The bacteria *B. amyloliquefaciens* and *B. methylophilicus* inhibited the growth of *P. cactorum* isolates more than 85% ($p=0.05$) when evaluated *in vitro*, and both antagonists showed PIRGs values lower than 50 and 20% ($p=0.05$), respectively, when they were confronted against *Pythium* spp. *Bacillus amyloliquefaciens* showed a PIRG ranging from 85.1 to 93.8% when it was confronted against *P. cactorum* and from 2.4 to 47.6% ($p=0.05$) against *Pythium* spp. at the sixth day post-confrontation. *Bacillus methylophilicus* showed the same trend, with a PIRG of 1.4 to 18.8% ($p=0.05$) when it was confronted against *Pythium* spp. and a PIRG value higher than 85% ($p=0.05$) in *P. cactorum* isolates (Table 4; Fig. 1 d-f). Both bacteria showed high PIRG in confrontations with *P. cactorum* isolates, reflecting probably the production of antibiotics, enzymes that attack

y >81% en aislados de *P. cactorum*. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con *T. asperellum* (Cuadro 4). Por otra parte, *T. atroviride* mostró la misma tendencia con valores de PICR de 11.8 a 26.3% ($p=0.05$) en aislados de *Pythium* spp. y >89% ($p=0.05$) en aislados de *P. cactorum* al quinto y sexto día post-confrontación, respectivamente (Cuadro 4; Figura 1c). En este estudio, *T. atroviride* fue el mejor agente de control para la inhibición del crecimiento de *P. cactorum* en medio PDA. Gajera y Vakharia (2010) también observaron que *T. atroviride* fue efectivo en reducir la incidencia de pudrición de cuello, reduciendo la virulencia del patógeno. Roiger y Jeffers (1991) sugirieron que las especies de *Trichoderma* son promisorios agentes de control biológico a *P. cactorum*, porque su uso es compatible con prácticas de manejo y otras enfermedades de raíz, incluyendo el uso de plaguicidas. Las especies de *Trichoderma* también mostraron actividades de promoción de crecimiento vegetal, sugiriendo otro beneficio potencial para su uso. De acuerdo con la escala de Bell, se mostró un antagonismo Tipo 1 para las cuatro especies de *Trichoderma*, donde el antagonista (*Trichoderma*) sobrecreció completamente la colonia del patógeno y cubrió completamente el medio, después de seis días post-inoculación contra aislados de *Phytophthora*.

Actividad antagonista *in vitro* de *Bacillus* spp. vs Oomicetos

Las bacterias *B. amyloliquefaciens* y *B. methylotrophicus* inhibieron el crecimiento de aislados de *P. cactorum* en más del 85% ($p=0.05$) al ser evaluadas *in vitro*, y ambos antagonistas mostraron valores de PICR menores al 50 y 20% ($p=0.05$), respectivamente, cuando fueron confrontados contra *Pythium* spp. *Bacillus amyloliquefaciens* mostró un PICR fluctuando de 85.1 a 93.8% cuando fue

the cell components of the pathogens or volatile compounds that inhibit the growth of the pathogen. However, a dissimilar behavior was observed when they were confronted with *Pythium* species exhibiting fast growth, and the rates of the PIRG were low compared with the *P. cactorum* isolates when confronted *in vitro* against *Bacillus* spp. (Table 4). Jeyaseelan *et al.* (2012) evaluated the antagonistic effect of some *Bacillus* species against *Pythium aphanidermatum* and also observed a low inhibition effect by some antagonistic species such as those tested in the present study, reflecting the inability of *Bacillus* species to produce highly effective antimicrobial compounds against some *Pythium* species. According to Guillén-Cruz *et al.* (2006), the *Bacillus* genus showed antagonistic effects *in vitro* against *Phytophthora* spp. with *B. amyloliquefaciens* being the most efficient and showing a plant growth promoter effect, likely contributing to the setting of macronutrients and the solubilization of phosphates and other micronutrients.

Notably, *Bacillus* species showed an inhibition halo >29 mm when it was confronted against *P. cactorum*, at 6 d post-confrontation and there was no contact day (Table 5). Some of the most important mechanisms of antagonistic bacteria such as *Bacillus* are the antibiosis, consisting on the production of antibiotic compounds and the inhibition of other microbes (Intana *et al.*, 2008). Souto *et al.* (2004) demonstrated that *B. amyloliquefaciens* exerted antifungal properties and that it might be considered as a good biological control agent. Dev-Sharma *et al.* (2013) obtained >90% inhibition in phytopathogenic fungi when they were confronted *in vitro* against *B. methylotrophicus*. Silo-Suh *et al.* (1994) reported that some *Bacillus* species have the ability to produce effective and broad-spectrum antibiotics, such as peptides, lipopeptides, aminoglycosides and

confrontado contra *P. cactorum* y de 2.4 a 47.6% ($p=0.05$) contra *Pythium* spp. al sexto día post-confrontación. *Bacillus methylotrophicus* mostró la misma tendencia, con un PICR de 1.4 a 18.8% ($p=0.05$) cuando fue confrontado contra *Pythium* spp. y un valor de PICR superior al 85% ($p=0.05$) en aislados de *P. cactorum* (Cuadro 4; Figura 1 d-f). Ambas bacterias mostraron altos PICR en confrontaciones con aislados de *P. cactorum*, reflejando probablemente la producción de antibióticos, enzimas que atacan los componentes de las células de patógenos o compuestos volátiles que inhiben el crecimiento del patógeno. Sin embargo, se observó un comportamiento diferente cuando fueron confrontados con especies de *Pythium* exhibiendo rápido crecimiento, y los rangos de PICR fueron bajos comparados con los aislados de *P. cactorum* cuando fueron confrontados *in vitro* contra *Bacillus* spp. (Cuadro 4). Jeyaseelan *et al.* (2012) evaluaron el efecto antagonista de algunas especies de *Bacillus* contra *Pythium aphanidermatum* y también observaron un bajo efecto de inhibición por algunas especies antagonistas como las evaluadas en el presente estudio, reflejando la incapacidad de las especies de *Bacillus* para producir compuestos antimicrobianos altamente efectivos contra algunas especies de *Pythium*. De acuerdo con Guillén-Cruz *et al.* (2006), el género *Bacillus* mostró efectos antagonistas *in vitro* contra *Phytophthora* spp., siendo *B. amyloliquefaciens* el más eficiente y mostrando un efecto de promoción de crecimiento vegetal, probablemente contribuyendo a la fijación de los macronutrientes y la solubilización de fosfatos y otros micronutrientes.

Notablemente, las especies de *Bacillus* mostraron un halo de inhibición >29 mm cuando fueron confrontadas contra *P. cactorum* a los 6 d post-confrontación y no hubo día de contacto (Cuadro 5). Algunos de los mecanismos más importantes de las bacterias antagonistas como *Bacillus* son la an-

aminopolyols. Moreover, Wheatley (2002) referred to the volatile organic compounds produced by different bacteria and fungi as ideal in microbial interactions, reflecting efficacy over a wide range of spatial scales, inhibiting the growth of many pathogenic fungi, as these compounds have direct or indirect effects on the activity of specific fungal enzymes.

CONCLUSIONS

Fungi and Oomycetes were the most abundant in collected isolates, with *Fusarium oxysporum* being the most representative species. The 1-year-old G.935, Standard and M.25 rootstocks were the most resistant to tested isolates, which could be attributed to the age and genotype of the rootstocks. Our results demonstrated that both antagonistic groups could be considered as candidates to be used as biological control agents for *P. cactorum*, which is important causal agent of root diseases in apple rootstocks. Further *in vitro* and *in vivo* studies are required to confirm the effectiveness of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates against various causal agents of root diseases in apple orchards in Chihuahua.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Fundación Produce Chihuahua, Mexico, for funding this research under project 362. Maria Fernanda Ruiz Cisneros received a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) during her Master of Science study.

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



**Cuadro 5. Halo de inhibición mostrado cuando se confrontaron *in vitro* especies de *Bacillus* contra Oomicetos a los seis días después de la inoculación.**  
**Table 5. Inhibition halo showed when confronted *in vitro* *Bacillus* species against Oomycetes at six days after inoculation.**

| Oomicetos                       | Halo de inhibición (mm) por las bacterias ± DE |                             |
|---------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                 | <i>B. methylotrophicus</i>                     | <i>B. amyloliquefaciens</i> |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c1 | 31.4±0.6a <sup>*</sup>                         | 31.8±0.3a                   |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c2 | 31.5±0.9a                                      | 31.6±1.8a                   |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c3 | 29.5±0.7b                                      | 29.35±0.4b                  |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c4 | 30.0±1.0ab                                     | 30.8±0.5ab                  |
| <i>Pythium irregulare</i>       | 0c                                             | 0c                          |
| <i>Pythium ultimum</i>          | 0c                                             | 0c                          |
| <i>Pythium</i> sp.              | 0c                                             | 0c                          |

<sup>\*</sup>Las letras en la misma columna indicaron diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra no son diferentes significativamente (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p=0.05$ ) / <sup>\*</sup>Letters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ( $p=0.05$ ).

tibiosis, consistiendo en la producción de compuestos antibióticos y la inhibición de otros microbios (Intana *et al.*, 2008). Souto *et al.* (2004) demostraron que *B. amyloliquefaciens* ejerce propiedades antifúngicas y que puede ser considerado como un buen agente de control biológico. Dev-Sharma *et al.* (2013) obtuvieron >90% de inhibición en hongos fitopatógenos cuando fueron confrontados *in vitro* contra *B. methylotrophicus*. Silo-Suh *et al.* (1994) reportaron que algunas especies de *Bacillus* tienen la habilidad de producir efectivos antibióticos de amplio espectro, tales como péptidos, lipopéptidos, aminoglicósidos y aminopolióles. Por otra parte, Wheatley (2002) se refirió a los compuestos orgánicos volátiles producidos por diferentes bacterias y hongos como ideales en las interacciones microbianas, reflejando su eficacia sobre un amplio rango de escalas espaciales, inhibiendo el crecimiento de muchos hongos patógenos, ya que estos compuestos tienen efectos directos o indirectos en la actividad de enzimas fúngicas específicas.

## CONCLUSIONES

Los hongos y Oomicetos fueron los más abundantes en los aislados recolectados, siendo *Fusarium oxysporum* la especie más representativa. Los portainjertos de 1 año de edad G.935, Estándar y M.25 fueron los más resistentes a los aislados probados, lo cual se puede atribuir a la edad y genotipo de los portainjertos. Nuestros resultados demostraron que ambos grupos antagonistas pueden ser considerados como candidatos para ser usados como agentes de control biológico para *P. cactorum*, el cual es un importante agente causal de enfermedades de raíz en portainjertos de manzano. Se requieren estudios adicionales *in vitro* e *in vivo* para confirmar la efectividad de aislados de *Trichoderma* y *Bacillus* contra varios agentes causales de enfermedades de raíz en huertos de manzano en Chihuahua.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Produce Chihuahua, México, por el financiamiento de esta investigación bajo el proyecto 362. María Fernanda Ruiz Cisneros recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante sus estudios de Maestría en Ciencias.

## LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Molecular Biology* 15: 403–410. [https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Barnett, H.L., y Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi (3rd ed.). The American Phytopathological Society. U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 218p.
- Bell D, Well H y Markham C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379–382. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04\\_379.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF)
- Carreri R, Raimo F, Pentangelo A y Lahoz E. 2013. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Crop Protection* 43: 31–37. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.013>
- Cooney JM, Lauren DR y di-Menna ME. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 522–526. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0006372>
- Dev-Sharma SC, Shovon MS, Sarwar-Jahan MG, Asaduzzaman AK, Rahman Md.A, Biswas KK y Roy N. 2013. Antibacterial and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus* SCS 2012 isolated from soil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(4): 2293–2307. Disponible en línea: [http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2013/02/jmbfs\\_0247\\_devsharma.pdf](http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2013/02/jmbfs_0247_devsharma.pdf)
- Dugan FM. 2006. The Identification of fungi. An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. The American Phytopathological Society. U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 176p.
- Ezziyyani M, Sánchez C, Requena ME, Rubio L y Candela ME. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69–78. Disponible en línea: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>
- Gajera HP y Vakharia DN. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 274–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2010.04.005>
- Guillén-Cruz R, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Padrón-Corral E y Reyes-Valdés MH. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2): 105–114. Disponible en línea: <http://www.re-dalyc.org/pdf/612/61224204.pdf>
- Hantula J, Lilja A, Nuorteva H, Parikka P y Werres S. 2000. Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. *Mycological Research* 104(9): 1062–1068. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002999>
- Hsuan HM, Salleh B y Zakaria L. 2011. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 6722–6732. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12106722>
- Intana W, Yenjit P, Suwanno T, Sattasakulchai S, Suwanno M y Chamswarn C. 2008. Efficacy of antifungal metabolites *Bacillus* spp. for controlling tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Walailak Journal Science and Technology* 5(1): 29–38. Disponible en línea: <http://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/view/108/92>
- Jeyaseelan EC, Tharmila S y Niranjan K. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato Damping Off. *Archives of Applied Science Research* 4(4): 1623–1627. Disponible en línea: <http://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/antagonistic-activity-of-trichoderma-spp-and-bacillus-spp-against-pythium-aphanidermatum-isolated-from-tomato-damping-of.pdf>
- Ju R, Zhao Y, Li J, Jiang H, Liu P, Yang T, Bao Z, Zhou B, Zhou X y Liu X. 2014. Identification and evaluation of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Annals of Microbiology* 64: 377–383. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-013-0672-3>
- Kamal S, Prasad R y Varma A. 2010. Soil microbial diversity in relation to heavy metals Soil Heavy Metals. Springer Berlin Heidelberg. 19:31–63. [https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436Lamichhane JR y Venturi V. 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. <i>Frontiers in Plant Science</i> 6(385): 1-12. <a href=)
- Latorre BA, Rioja ME y Wilcox WF. 2001. *Phytophthora* species associated with crown and root rot of apple in Chile. *Plant Disease* 85: 603–606. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.6.603>
- Leslie JF, Anderson LL, Bowden RL y Lee YW. 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 119: 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.059>
- Manici LM, Ciavatta C, Keledeker M y Erschbaumer G. 2003. Replant problems in South Tyrol: role of fungal pathogens and microbial population in conventional and organic

- apple orchards. *Plant and Soil* 256: 315–324. <http://doi.org/10.1023/A:1026103001592>
- Manici LM, Kelderer M, Franke-Whittle IH, Rühmer T, Baab G, Nicoletti F y Neaf A. 2013. Relationship between root-endophytic microbial communities and replant diseases in specialized apple growing areas in Europe. *Applied Soil Ecology* 72: 207–214. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.011>
- Pérez-Corral DA, García-González NY, Gallegos-Morales G, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI y Rios-Velasco C. 2015. Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonísticos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(7): 1629–1638. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a16.pdf>
- Raeder U y Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17–20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Ramírez-Legarreta MR, Jacobo-Cuéllar JL, Marioni-Ávila MR y Parra-Quezada RA. 2004. Eficiencia del uso de plaguicidas en huertos de manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 403–413. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222314.pdf>
- Ramírez-Legarreta MR, Ruiz-Corral JA, Medina-García G, Jacobo-Cuéllar JL, Parra-Quezada RA, Ávila-Marioni MR y Armando-Álvarez JP. 2011. Perspectivas del sistema de producción de manzano en Chihuahua, ante el cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 265–279. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2nspe2/v2spe2a8.pdf>
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JM, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(1): 84–99. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Roiger DJ, y Jeffers SN. 1991. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedlings. *Phytopathology* 81: 910–917. <http://doi.org/10.1094/Phyto-81-910>
- Rumberger, A., Merwin, I.A., y Thies, J.E. 2007. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 1645–1654. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.023>
- Samaniego-Gaxiola JA. 2007. Research perspectives on *Phymatotrichopsis omnivora* and the disease it causes. *Agricultura Técnica en México* 33: 309–318. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agritm/v33n3/v33n3a10.pdf>
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide. Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G, Pasquali M y Migheli Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology* 14(4): 323–341. <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>
- Schoenborn L, Yates PS, Grinton BE, Hugenholtz P, y Janssen PH. 2004. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7): 4363–4366. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4363-4366.2004>
- Serdani M, Kang JC, Andersen B y Crous PW. 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106: 561–569. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005993>
- Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J y Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2023–2030. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201597/pdf/aem00023-0329.pdf>
- Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Bachur M y García AF. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247–1256. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x>
- Tewoldemedhin YT, Mazzola M, Botha WJ, Spies CFJ y McLeod A. 2011a. Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 130: 215–229. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9747-9>
- Tewoldemedhin YT, Mazzola M, Labuschagne I y McLeod A. 2011b. A multi-phasic approach reveals that apple replant disease is caused by multiple biological agents, with some agents acting synergistically. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1917–1927. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.014>
- Uthkede RS y Smith EM. 1991. *Phytophthora* and *Pythium* species associated with root rot of young apple trees and their control. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 1059–1063. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90044-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90044-K)
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species (3rd ed.): CRC Press.
- Wheatley RE. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 357–364. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020592802234>
- White TJ, Bruns T, Lee S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Press, A. (Ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. pp. 315–322. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wilcox WF. 1993. Incidence and severity of crown and root rots on four apple rootstocks following exposure to *Phytophthora* species and waterlogging. *Journal of American Society of Horticultural Science* 118(1): 63–67. Disponible en línea: <http://journal.ashspublications.org/content/118/1/63.full.pdf+html>
- Yao S, Merwin I A, Abawi GS y Thies JE. 2006. Soil fumigation and compost amendment alter oil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 587–599. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.026>

# Dieback disease of *Prunus* sp. associated to *Armillaria* spp. in commercial orchards in Michoacan, Mexico

## Muerte descendente de *Prunus* sp. asociada a *Armillaria* spp. en huertas comerciales de Michoacán, México

**Patricia Rivas-Valencia\***, **Alejandra Almaraz-Sánchez**, **Adriana Cano-Salgado**, Campo Experimental Valle de México-INIFAP. Km. 13.5 Carretera Los Reyes-Textcoco. C.P. 56250. Coatlinchán, Estado de México; **Lervin Hernández-Ramos**, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SENASICA-SAGARPA. Km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México; **Iobana Alanís-Martínez**, Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA. Km. 21 Carretera Amazcala-Chichimequillas, Municipio El Marqués C.P. 76247, Santiago de Querétaro, Querétaro; **Mario Rafael Fernández-Montes**, Sitio Experimental Querétaro-INIFAP. Luis Pasteur 414, Colonia Valle Alameda C.P. 76040 Santiago de Querétaro, Querétaro. \*Autor para correspondencia: rivas.patricia@inifap.gob.mx.

**Recibido:** 17 de Febrero, 2017.

**Aceptado:** 30 de Junio, 2017.

Rivas-Valencia P, Almaraz-Sánchez A, Cano-Salgado A, Hernández-Ramos L, Alanís-Martínez I, Fernández-Montes MR. 2017. Dieback disease of *Prunus* sp. associated an *Armillaria* spp. in commercial orchards in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 463-475.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1702-1

Primera publicación DOI: 29 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 29, 2017.

**Resumen.** El área productora de durazno (*Prunus persica*) y ciruelo (*Prunus domestica*) en Michoacán, se localiza en el municipio de Zinapécuaro. Recientemente se han presentado síntomas de un deterioro progresivo de los árboles que les ocasiona la muerte, poniendo en riesgo la producción de fruta. El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar molecularmente el patógeno

**Abstract.** The producing area of peach (*Prunus persica*) and plum (*Prunus domestica*) in Michoacan is located at Zinapécuaro county. Recently there have been symptoms of a progressive deterioration of trees that causes their death, increasing the risk of fruit production failure. The aim of this study was to identify and characterize molecularly the responsible pathogen. Five sites with previous experiences of having the problem were sampled: root, trunk and soil samples were collected. Signs of *Armillaria* spp. were found, which was confirmed by molecular sequencing of the Tef-1 $\alpha$  gene (translation elongation factor 1 $\alpha$ ). The phylogenetic analysis performed, grouped the sequences as new species, phylogenetically related in the same clade as *A. mellea*, which is a very aggressive pathogen. At present in Mexico, tolerant rootstocks have not been identified and it is therefore recommended to continue searching for genetic resistance and improve orchard disease management.

responsable. En las localidades de Ucareo, Jeráhuaro, Huajúbaro, San Joaquín y La Galera con antecedentes del problema, se colectaron muestras de raíz, tronco y suelo. Se identificaron signos característicos del hongo *Armillaria* spp., confirmado por secuenciación molecular del gen Tef-1 $\alpha$  (translation elongation factor 1 $\alpha$ ). El análisis filogenético agrupó las secuencias como dos especies nuevas, filogenéticamente emparentada en el mismo clado que *A. mellea*, que es una especie patógena agresiva. En México no se cuenta actualmente con portainjertos tolerantes, y por tanto, se recomienda continuar con estudios de búsqueda de resistencia genética y manejo de la enfermedad en las huertas.

**Palabras clave:** Caracterización molecular, análisis filogenético, Tef-1 $\alpha$ , secuenciación molecular.

El área con mayor producción de durazno (*Prunus persica*) y ciruelo (*Prunus domestica*) en Michoacán, se localiza en el Municipio de Zinapécuaro al noroeste del estado, en las coordenadas 19° 52' de latitud norte y 100° 50' de longitud oeste, con una altitud de 2400 a 2700 msnm. El relieve lo constituye el Eje Volcánico Transversal, con clima templado con lluvias en verano. La precipitación pluvial anual promedio es de 622 mm y temperaturas entre los 3 y 34 °C (Villaseñor, 2005). El área productora de durazno y ciruelo se ha extendido en áreas de bosque mixto de pino-encino y abeto-pino, con una superficie sembrada de 1256 ha, que representa el 30 % de la superficie estatal y se concentra en cinco localidades: Ucareo, Jeráhuaro, Huajúbaro, San Joaquín y La Galera, con una producción anual de 6950 t y un valor de la producción de \$41.7 millones de pesos (SAGARPA, 2015). En Michoacán la superficie sembrada de ciruelo en 2014 fue 2827 ha, con una producción de 13,316 t

**Key words:** Molecular characterization, phylogenetic analysis, Tef-1 $\alpha$ , molecular sequence.

The largest peach (*Prunus persica*) and plum (*Prunus domestica*) producing area in Michoacan is located at Zinapécuaro county (19° 52' northern latitude, 100° 50' western longitude and 2400 to 2700 masl) in the northwestern area of the state. The topography includes the Trans-Mexican Volcanic Belt, with temperate climate and summer rains. The average annual rainfall is 622 mm and temperatures range between 3 and 34 °C (Villaseñor, 2005). The peach and plum producing area has expanded to areas of mixed pine-oak and fir-oak forests; the peach production area planted on 1256 ha represents 30 % of the state's total area, and is concentrated in five locations: Ucareo, Jeráhuaro, Huajúbaro, San Joaquin and La Galera, where 6,950 tons valued at \$ 41.7 million pesos were harvested in 2015 (SAGARPA, 2015). The area planted to plum was 2827 ha in 2014, which produced 13,316 tons valued at \$ 47.1 million pesos (SAGARPA, 2014).

In recent years, peach and plum trees in some commercial orchards have been affected by progressive damage and gradual death that may occur within a few months. The first symptoms appear during the flowering stage (leaf wilting, yellowing at the top of the trees, stunting, base canker, tree neck exudate, lack of vigor and death).

The *Armillaria* genus includes over 40 species. Identifying this genus based on morphological traits is complicated because, in most cases, only asexual or vegetative structures are found. One of the issues extensively discussed in the literature is the lack of sexual structures that would allow identifying the genus based on classical taxonomy (Kim *et al.*, 2006; Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012). Over the past few years, molecular data,

y un valor de producción de 47.1 millones de pesos (SAGARPA, 2014).

En los últimos años, en algunas huertas comerciales, los árboles de durazno y ciruelo han sido afectados por un deterioro progresivo y la muerte paulatina de los mismos, la cual puede ocurrir en meses, presentándose los primeros síntomas durante la floración que pueden ser marchitez en hojas, amarillamiento de la copa del árbol, achaparramiento, cancro basal, exudado en el cuello del árbol, falta de vigor y muerte.

El género *Armillaria* incluye más de 40 especies, su identificación a partir de los caracteres morfológicos es complicada, debido a que en la mayoría de los casos, solo se encuentran estructuras asexuales o vegetativas, uno de los puntos que se ha discutido ampliamente en la literatura es la falta de estructuras sexuales para realizar la identificación taxonómica clásica (Kim *et al.*, 2006; Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012). En los últimos años, los datos moleculares, específicamente las secuencias de ADN, se están utilizando para identificar las especies de hongos y realizar estudios filogenéticos (Cai *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2017). En la taxonomía contemporánea de este hongo, las comparaciones de secuencias de ADN han llevado al descubrimiento de una serie de nuevas especies que no están relacionadas con especies morfológicas (Maphosa *et al.*, 2006), lo cual ha tenido implicaciones en la identificación de este organismo.

Las especies del género *Armillaria* se han detectado en bosques naturales y huertas frutícolas (Cibrián *et al.*, 2007) y se puede comportar como saprófitas o patógenas (Ross-Davis *et al.*, 2012). Aún con el desplante de árboles infectados, el micelio sobrevive como saprófito, las raíces residuales

specifically DNA sequences, have been used to identify species of fungi and conduct phylogenetic studies (Cai *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2017). With the contemporary taxonomy of this fungus, comparing DNA sequences has led to the discovery of new species that are not related to morphological species (Maphosa *et al.*, 2006), a fact that has had implications for identifying the fungus.

In natural forest areas and fruit orchards, species of *Armillaria* genus have been detected (Cibrián *et al.*, 2007) that behave as saprophytes or pathogens (Ross-Davis *et al.*, 2012). Even after infected trees are cut, the mycelium survives as a saprophyte, and residual roots can remain buried in the soil and serve as inoculum (Redfern and Filip, 1991). The inoculum can survive from a few years to decades (Baumgartner and Rizzo, 2001), and combined with the lack of efficient disease control methods (Adaskaveg *et al.*, 1999, Aguin-Casal *et al.*, 2006), contributes to significantly reduce fruit yields during the whole life of both infected orchards (Baumgartner, 2004) and subsequent orchards.

In Mexico, the fungus is distributed in the states of Baja California, Chiapas, Chihuahua, State of Mexico, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacan, Morelos, Nuevo Leon, Oaxaca, Puebla, Queretaro, Veracruz and in forest areas of Mexico City (Valdés *et al.*, 2004; Cibrián *et al.*, 2007; Elías-Román *et al.*, 2013; Klopfenstein *et al.*, 2014; Fernández-Pavía, *et al.*, 2015). The objective of this research was to identify and molecularly characterize the pathogen associated with dieback of peach and plum trees. The hypothesis of this research was that *Armillaria* spp. is responsible for causing peach and plum tree dieback in the fruit production area of Zinapecuaro county, Michoacan.

pueden permanecer enterradas en el suelo y sirven como inóculo (Redfern y Filip, 1991). El inóculo puede persistir durante algunos años o décadas (Baumgartner y Rizzo, 2001), esto combinado con la falta de métodos eficientes para prevenir, controlar o curar (Adaskaveg *et al.*, 1999, Aguín-Casal *et al.*, 2006), contribuye a reducir significativamente los rendimientos durante toda la vida de una plantación infectada (Baumgartner, 2004) y la de sucesivas plantaciones.

En México, este hongo se distribuye en los estados de Baja California, Chiapas, Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y en áreas forestales de la Ciudad de México (Valdés *et al.*, 2004; Cibrián *et al.*, 2007; Elías-Román *et al.*, 2013; Klopfenstein *et al.*, 2014; Fernández-Pavía, *et al.*, 2015). El objetivo de este trabajo fue la identificación y caracterización molecular del patógeno asociado a la muerte descendente de los árboles de durazno y ciruelo. La hipótesis de este trabajo se basó en la presencia de *Armillaria* spp. como responsable de la muerte descendente de árboles de durazno y ciruelo en la zona productora de Zinapécuaro, Michoacán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

En 2015 y 2016, se realizaron recorridos de campo y se seleccionaron cinco sitios de muestreo en huertas comerciales de durazno y ciruelo, ubicadas en la parte alta, media y baja de la zona productora de Zinapécuaro (Cuadro 1). En cada sitio se identificaron árboles con diversos síntomas de deterioro, como marchitez en hojas, amarillamiento de la copa del árbol, achaparramiento,

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

In 2015 and 2016, five sites were sampled in peach and plum commercial orchards located at the upper, intermediate and lower part of the Zinapécuaro production area (Table 1). Trees were identified with different damage symptoms (leaf wilting, tree top yellowing, stunting, basal canker, neck exudate, lack of vigor and death) at each site. A destructive sampling was undertaken to collect samples of primary and secondary roots and trunks at a height of 15-30 cm. It was verified that pathogenic signs and symptoms were present in the root system of the tree, where in some cases rhizomorphs, typical vegetative structures of *Armillaria*, and whitish-brown mycelial fans between bark and wood were found. Soil samples were taken at a depth of 30-60 cm.

### Processing plant and soil samples

Samples of plant material were thoroughly washed to remove soil; they were then cut into pieces 1 cm long, placed in 1.1 % sodium hypochlorite and gently shaken for 10 min. The pieces were then immersed in 70 % alcohol and washed with sterile distilled water between changes. The rhizomorphs were washed with 3 % hydrogen peroxide for 5 min, rinsed twice with sterile distilled water and dried with sterile paper towels, following the method of Harrington *et al.* (1992). Around 15-20 woodchips with mycelium and brown-to-black rhizomorphs were sown in Petri dishes containing BDS (Benomyl-Dicloran-Streptomycin) selective culture medium (Worrall, 1991; Aguín *et al.*, 1998). The dishes were covered with aluminum foil, placed in polypaper bags and incubated at 20 °C in darkness during 4-5 weeks.

**Cuadro 1. Sitios de colecta de muestras de raíz y tronco de *Prunus* sp. y suelo del municipio de Zinapécuaro, Michoacán 2016.****Table 1. Sites where samples of roots and trunks of *Prunus* sp. and soil were collected in the Zinapécuaro county, Michoacán, 2016.**

| Huerta | Altura (msnm) | Sitio       | Frutal  | Coord. geográficas<br>Longitud, Latitud | Variedad/Portainjerto             | Edad (años) |
|--------|---------------|-------------|---------|-----------------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| 1      | 2488          | Jeráhuaro   | Durazno | -100.6773, 19.8699                      | Fred/criollo                      | 4.5         |
| 2      | 2495          | Jeráhuaro   | Ciruelo | -100.6786, 19.8697                      | Moscatel/criollo                  | 20          |
| 3      | 2519          | La Hacienda | Durazno | -100.6886, 19.8601                      | Diamante/criollo                  | 1-46        |
| 4      | 2490          | Ucareo      | Durazno | -100.6790, 19.8941                      | Diamante mejorado/criollo         | 4-5         |
| 5      | 2539          | Casablanca  | Durazno | -100.6850, 19.8999                      | San Juan/criollo<br>Regio/criollo | 18          |

cancro basal, exudado en el cuello, falta de vigor y muerte. Se realizó un muestreo destructivo para tomar muestras de raíces primarias y secundarias y del tronco a una altura entre 15-30 cm. Se verificó la presencia de signos y síntomas de patógenos en el sistema radicular del árbol, encontrándose en algunos casos rizomorfos, estructura vegetativa típica de *Armillaria* y presencia de micelio de color blanco-marrón entre la corteza y la madera en forma de abanico. Se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 30-60 cm.

#### Procesamiento de muestras vegetales y de suelo

Las muestras de material vegetal fueron lavadas exhaustivamente con la finalidad de eliminar el suelo, se cortaron segmentos de 1 cm de longitud y se colocaron en hipoclorito de sodio al 1.1 % durante 10 min en agitación suave, posteriormente se sumergieron en alcohol al 70 % y se lavaron con agua destilada estéril entre cada cambio. Los rizomorfos fueron lavados con peróxido de hidrógeno al 3 % por 5 min y dos lavados de agua destilada estéril, secados con toallas de papel estériles de acuerdo a lo descrito por Harrington *et al.*, (1992). En cajas de petri con medio cultivo selectivo, BDS (Benomyl-Dicloran- Estreptomycin), (Worrall, 1991; Aguín *et al.*, 1998), se sembraron de 15 a 20 trozos de

To explore the mycoflora population present in soil at the collection sites, the soil dilution PDA-TS (potato-dextrose-agar-tergitol) technique was used (Steiner and Watson 1965). The dishes were kept at a temperature of 22-24 °C for 7 to 10 days, period during which the fungi developed. Isolates were transferred to water-agar medium to be purified using the hyphae-point technique and sown individually in dishes containing water agar and PDA.

#### Molecular identification. DNA extraction, specific amplification and sequencing

After obtaining pure isolates of the fungi, they were molecularly characterized. DNA extraction was performed using the AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen) kit, according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using the ARMEF-3-A (CGT GAY TTY ATC AAG AAC ATG) and ARMEF-R (TAC CCG TTC GGC GAT CAA TCT) primers designed in the amplified region for the Tef-1 $\alpha$  gen (translation elongation factor 1 $\alpha$ ) (Ross-Davis *et al.*, 2012). Amplified reactions were performed in a standard TProfessional thermocycler (Biometra, Germany) using a final volume of 25  $\mu$ L with the following reagents: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1 mM,



corteza con micelio y rizomorfos de color marrón a negro. Las cajas se cubrieron con papel aluminio y se guardaron dentro de bolsas de polipapel y se incubaron a 20 °C en oscuridad durante 4-5 semanas. Para explorar la población de la micoflora en suelo presente en los sitios de colecta, se utilizó la técnica de dilución de suelo PDA-TS (papa-dextrosa-agar tergitol) (Steiner y Watson 1965). Las cajas se mantuvieron a temperatura de 22-24 °C de 7 a 10 días, que fue el periodo en el que se desarrollaron los hongos. Los aislados se transfirieron a medio agua-agar para purificarlos mediante la técnica de punta de hifa y se sembraron por separado en cajas con medio agar-agua y PDA.

#### **Identificación molecular. Extracción de ADN, amplificación específica y secuenciación**

Una vez obtenidos los aislamientos puros de los hongos en estudio, se inició la caracterización molecular. La extracción del ADN se llevó a cabo con el Kit de extracción AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR utilizando los iniciadores ARMEF-3-A (CGT GAY TTY ATC AAG AAC ATG) y ARMEF-R (TAC CCG TTC GGC GAT CAA TCT) diseñados para la región que amplifica para el gen *Tef-1 $\alpha$*  (translation elongation factor 1 $\alpha$ ) (Ross-Davis *et al.*, 2012). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador TProfessional estándar (Biometra, Alemania) en un volumen final de 25  $\mu$ L con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP's 0.2mM, Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen, USA), 10  $\mu$ M de cada primer y 4  $\mu$ L de ADN total. El programa de amplificación fue el siguiente: 96 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 45 s, y una extensión final a 72 °C por 4 min. Se verificó

dNTP's 0.2mM, Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen, USA), 10  $\mu$ M of each primer and 4  $\mu$ L of total DNA. The amplification program was as follows: 96 °C for 3 min, 35 cycles at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 45 s, and a final extension at 72 °C for 4 min. To verify the presence of the fragment electrophoresis in 2 % agarose gels stained with ethidium bromide (5 mg L<sup>-1</sup>) was utilized; the gels were documented using the Gel Doc (Bio-Rad, USA) photo documentation system. The PCR products were purified and sequenced in both directions by the Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

#### **Multiple alignment and phylogenetic analysis**

Sequences of the *TEF-1 $\alpha$*  gene in the isolates were edited and manually aligned using BioEdit 7.2.5 software (Hall, 1999). The sequences were compared with those available in the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database using the BLAST® algorithm. For the phylogenetic analysis, all the sequences of *Armillaria* spp. isolates from Michoacan were grouped in a single consensus sequence, and sequences of isolates of 34 *Armillaria* species characterized worldwide were used, according to the method of Maphosa *et al.* (2006), Hasegawa *et al.* (2010), Ross-Davis *et al.* (2012), Elías-Román *et al.* (2013) and Guo *et al.* (2016). *Pleurotus ostreatus* (NCBI accession number AY883432) was used as a root node outside the group. All the sequences were aligned with the CLUSTAL-W algorithm and analyzed by the Neighbor-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987) using Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA 7). One thousand support value replications (*Bootstrap*) were used to obtain a consensus tree with a 50 % majority rule (Tamura *et al.*, 2004). For this task, the Kimura 2

la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y los geles se documentaron en el fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad, USA). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por la Compañía Macro-gen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

### Alineamiento múltiple y análisis filogenético

Las secuencias del gen TEF-1 $\alpha$  de los aislados fueron editadas y alineadas manualmente con el Software BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Las secuencias se compararon con las disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) mediante el algoritmo BLAST®.

Para el análisis filogenético, todas las secuencias del gen EF-1 $\alpha$  obtenidas de los aislados de *Armillaria* spp. de Michoacán se agruparon en una sola secuencia consenso. Además, se utilizaron secuencias de aislamientos de 34 especies de *Armillaria* caracterizadas a nivel mundial de acuerdo a lo reportado por Maphosa *et al.*, (2006), Hasegawa *et al.*, (2010), Ross-Davis *et al.*, (2012), Elías-Román *et al.*, (2013) y Guo *et al.*, (2016). Se utilizó a *Pleurotus ostreatus* (número de accesión en el NCBI AY883432) como nodo raíz externo al grupo. Todas las secuencias fueron alineadas con el algoritmo CLUSTAL-W, y se analizaron con el método Neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) utilizando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7). Se utilizaron 1000 réplicas de valores soporte (*Bootstrap*) para obtener un árbol consenso con una regla de mayoría del 50 % (Tamura *et al.*, 2004). Se utilizó el modelo de sustitución Parametro-2 de Kimura (K2P) de acuerdo con Hasegawa *et al.*, (2010).

Replacement Parameter-2 Model (K2P) was used, according to the method of Hasegawa *et al.* (2010).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological identification

The strains collected in orchards 1, 2 and 5 (Table 1) from the bark of trees infected with fungal mycelium had a fan-like growth pattern and the rhizomorphs from roots showed a cottony creamy yellow growth in the culture medium. Rhizomorphs with dichotomic growth formed after 20 days and hyphae characteristic of the *Armillaria* genus formed at 28 days. No basidiocarps were found at the study sites before, during or after the rainy season.

Samples of plant material collected from orchards 3 and 4 did not include *Armillaria* spp. isolates. The genera *Trichoderma* sp., *Pilatoporus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. and *Fomitopsis* sp. were found in the soil isolates from all the sampling sites. *Fomitopsis* sp. is an associated pathogen that can cause trees to decay and die (Cibrián *et al.*, 2007). In orchard 5, the presence of *Fusarium oxysporum* was detected, a root pathogen that damages the vascular system.

### Molecular identification. Multiple alignment and phylogenetic analysis

The DNA sequences obtained in this study do not have reliable coverage and have not been identified ( $\geq 99 \%$ ) as being one of the known species of *Armillaria* reported in NCBI; thus it appears to be a new species of the genus. However, the sequences were 99 % similar to those reported

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación morfológica

Las cepas obtenidas de las huertas 1, 2 y 5 (Cuadro 1) provenientes de la corteza de árboles infectados con micelio del hongo, cuyo patrón de crecimiento fue en forma de abanico y los aislados de los rizomorfos obtenidos de las raíces, presentaron un crecimiento en medio de cultivo con aspecto algodonoso de color amarillo cremoso en el centro. Después de 20 días se observó la formación de rizomorfos con crecimiento dicotómico, a los 28 días formación de hifas, características del género *Armillaria*. No se encontraron en los sitios de estudio la presencia de basidiocarpos, antes, durante y después del periodo de lluvias.

En las muestras de material vegetal de las huertas 3 y 4, no se aisló *Armillaria* spp. En todos los sitios de muestreo en los aislados del suelo se encontraron los géneros, *Trichoderma* sp, *Pilatoporus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fomitopsis* sp., este último es un patógeno asociado que puede contribuir en la muerte de árboles sujetos a procesos de decaimiento (Cibrián *et al.*, 2007). Además en la huerta 5 se detectó la presencia de *Fusarium oxysporum*, el cual es un patógeno de la raíz que ocasiona daños en el sistema vascular.

### Identificación molecular. Alineamiento múltiple y análisis filogenético

Las secuencias de ADN obtenidas en este estudio no tienen una cobertura e identidad confiable ( $\geq 99$  %) con ninguna de las especies conocidas del género *Armillaria* reportadas en el NCBI, por lo que aparentemente representan una nueva especie dentro del género. No obstante, las secuencias obtuvieron un 99 % de similaridad con aquellas reportadas como *Armillaria* spp. por Elías-Román

as being *Armillaria* spp. by Elías-Román *et al.* (2013), based on isolates from the State of Mexico, concluded that root rot in peach trees is caused by a species of the *Armillaria* genus that has not yet been described. The sequences obtained in this study are kept in the GeneBank with accession numbers KY611443 to KY611450 and are available. These sequences and those reported by Elías-Román *et al.* (2013) are from the same organism, which belongs to a species not yet described in the literature.

Based on the alignment of 48 sequences of the EF-1 $\alpha$  gene from at least 34 species of the *Armillaria* genus that have been characterized worldwide. Following the results reported by Maphosa *et al.* (2006), Hasegawa *et al.* (2010), Ross-Davis *et al.* (2012), Elías-Román *et al.* (2013) and Guo *et al.* (2016), a phylogenetic analysis was performed using the *Neighbor-joining* algorithm. A 50 % or higher probability consensus tree was obtained in which the *Armillaria* species were grouped into four main clades (Figure 1). The EF-1 $\alpha$  gene was useful for separating all the species. The studied sequences were grouped in the same clade as the species *Armillaria mellea*, but in different branches (Figure 1). This confirmed that they are new species that appear to be phylogenetically related to *A. mellea*. However, the phylogenetic analysis, BLAST and the sequence analysis (single-nucleotide polymorphisms, insertions and deletions) all clearly distinguish both organisms as being different species, which agrees with the results reported by Elías-Román *et al.* (2013) using the isolates obtained in the State of Mexico.

In the *Armillaria* genus, species grouped in the same clade as *A. mellea* and *A. ostoyae* are associated with or considered aggressive pathogens that usually cause diseases in various fruit and forest trees, compared with species that are saprophytes or that behave as weak pathogens and that are grouped in the other clades (Ross-Davis

*et al.*, (2013), quienes a partir de aislados provenientes del Estado de México concluyeron que la pudrición de raíces en árboles de durazno es originada por una especie del género *Armillaria* no descrita. Las secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en GenBank con los números de accesión KY611443 a KY611450 y están disponibles al público en general. Éstas secuencias y las reportadas por Elías-Román *et al.*, (2013) corresponden al mismo organismo, el cual representa a especies aún no descritas en la literatura existente.

Basado en el alineamiento de 48 secuencias del gen EF-1 $\alpha$  pertenecientes al menos a 34 especies del género *Armillaria* caracterizadas a nivel mundial, de acuerdo a lo reportado por Maphosa *et al.*, (2006), Hasegawa *et al.*, (2010), Ross-Davis *et al.*, (2012), Elías-Román *et al.*, (2013) y Guo *et al.*, (2016), se realizó el análisis filogenético mediante el algoritmo *Neighbor-joining* con el cual se obtuvo un árbol consenso de probabilidades superior al 50 %, en el cual las especies de *Armillaria* se agruparon en cuatro clados principales (Figura 1). El gen EF-1 $\alpha$  fue útil para separar a todas las especies. Las secuencias del estudio se agruparon en el mismo clado que las secuencias de la especie *Armillaria mellea*, pero en ramas diferentes (Figura 1), confirmando que se trata de especies nuevas que al parecer están filogenéticamente relacionadas con *A. mellea*. Sin embargo, tanto el análisis filogenético, el BLAST y el análisis de secuencias (polimorfismos de un solo nucleótido e inserciones y deleciones) separan claramente a ambos organismos como especies distintas, lo cual coincide con lo reportado por Elías-Román *et al.*, (2013) con los aislados que obtuvieron en el Estado de México.

En el género *Armillaria* las especies que se agrupan en el mismo clado que *A. mellea* y *A. ostoyae* se asocian o se consideran como patógenos agresivos que regularmente pueden causar enfermedades en diversos árboles frutales y forestales,

*et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016). In this study, the phylogenetic analysis grouped the sequences in the same clade as *A. mellea* sequences that have been reported in North America, Asia and Europe.

In a parallel study, the cumulative incidence of dieback over three years in orchard 1 was calculated at 21.3 % (145/679 trees) (Rivas-Valencia and Fernández-Montes *et al.*, 2017). This could be interpreted as being an epidemic of great importance, caused by a species of *Armillaria* closely related to *A. mellea*.

The information about new *Armillaria* species in Mexico is based on reports from Alvarado and Blanchette (1994) on native species from forest regions of central Mexico showed that some of the isolates obtained in the state of Puebla were not compatible with reference isolates of species known in North America, which suggests that they belong to a different species. Due to the lack of sequences, it is not known if those isolates belong to the same biological species studied in this research. However, using biotechnological tools and, specifically, DNA sequence data, it is possible to identify the *Armillaria* species, which is essential to evaluate the threat of disease and its required management.

## CONCLUSIONS

Dieback of peach and plum trees at Zinapécuaro county, Michoacan, is associated with the presence of the *Armillaria* genus. Based on the analysis of DNA sequences, two isolates were identified in Michoacan that differ from those obtained in peach orchards in the State of Mexico. Isolates of *Armillaria* from Michoacan and the State of Mexico are genetically related to *A. mellea*, considered to be an aggressive pathogen. No tolerant rootstocks to *Armillaria* have been identified so far; therefore,

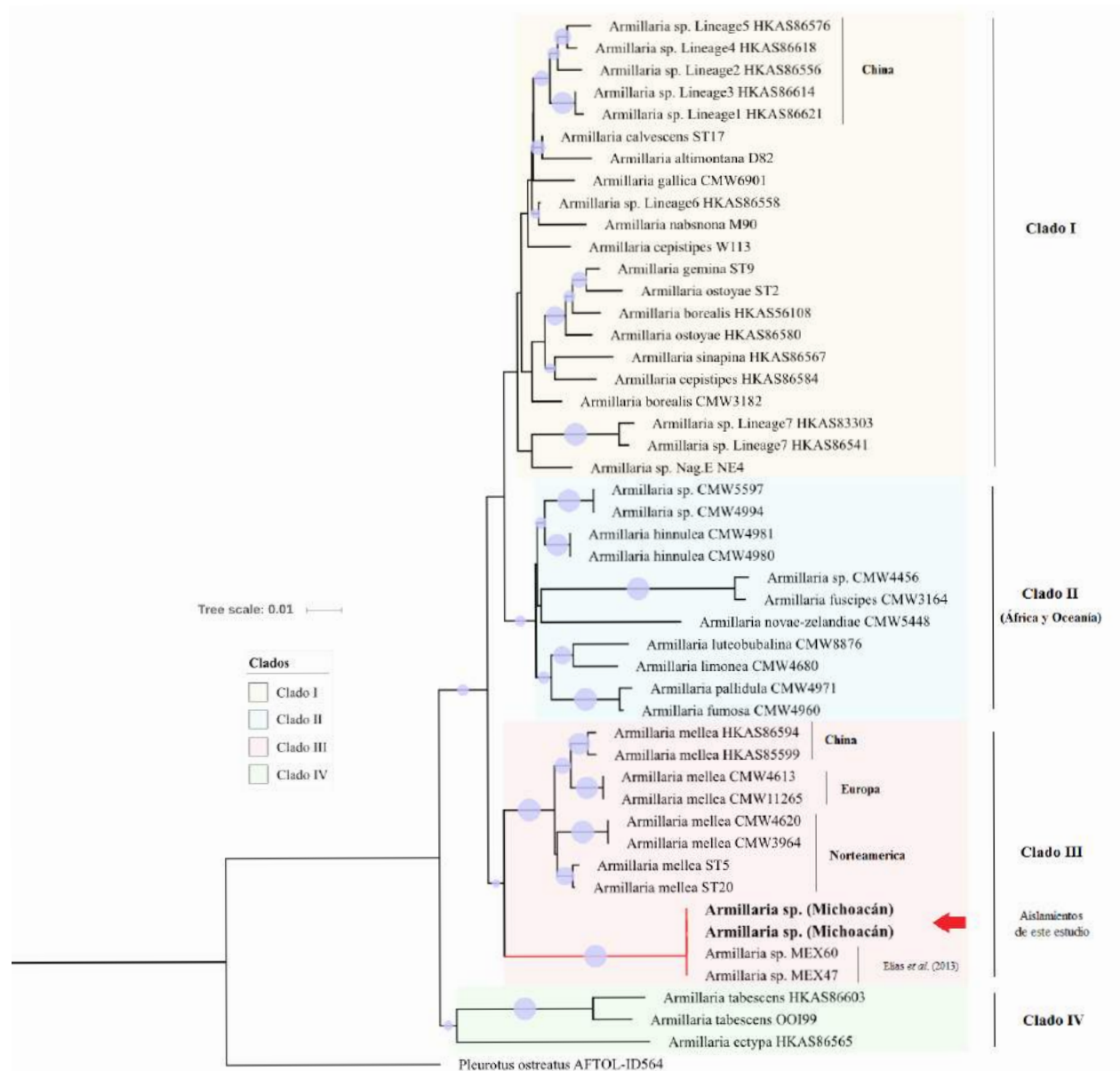


Figura 1. Filogenia del género *Armillaria* derivada mediante el algoritmo *Neighbor-joining* (NJ) inferida a partir de secuencias del gen *EF-1 $\alpha$* , incluyendo aislamientos colectados en Michoacán México. Una topología similar se obtuvo con ML y MP. Se utilizó a *Pleurotus ostreatus* como nodo raíz externo al grupo. Los valores de soporte *Bootstrap* (1000 réplicas) para NJ ( $\geq 50\%$ ) están simbolizados en los internodos con un círculo azul.

Figure 1. Phylogenetics of *Armillaria* genus developed using the *Neighbor-joining* (NJ) algorithm inferred from sequences of the *EF-1 $\alpha$*  gen, including isolates collected in Michoacan, Mexico. A similar topology was obtained using ML and MP. *Pleurotus ostreatus* was used as a root node outside the group. *Bootstrap* support values (1000 replications) for NJ ( $\geq 50\%$ ) are shown in the internodes with a blue circle.

en comparación con las especies saprófitas o que se comportan como patógenos débiles que se agrupan en los otros clados (Ross-Davis *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016). En este estudio el análisis filogenético agrupa a las secuencias en el mismo clado que aquellas de *A. mellea* reportadas para Norteamérica, Asia y Europa.

En un estudio paralelo a este, se calculó la incidencia acumulada de tres años de muerte descendente para la huerta 1, con un valor de 21.34 % (145/679 árboles) (Rivas-Valencia y Fernández-Montes *et al.* 2017), lo cual puede interpretarse como una epidemia de intensidad importante, la cual es ocasionada por una especie de *Armillaria* estrechamente relacionada con *A. mellea*.

La documentación de nuevas especies de *Armillaria* en México tiene sus antecedentes en lo reportado por Alvarado y Blanchette (1994), quienes en un estudio de las especies nativas de las regiones forestales del centro de México demostraron que algunos aislados obtenidos en el Estado de Puebla fueron incompatibles con cepas de referencia de especies conocidas en Norteamérica, sugiriendo que estos correspondían a una especie diferente. Debido a la falta de secuencias se desconoce si esos aislados corresponden a la misma especie biológica de esta investigación. Sin embargo, con el uso de las herramientas biotecnológicas y específicamente los datos de las secuencias de ADN, se puede identificar la especie de *Armillaria*, lo cual es fundamental para la evaluación del riesgo de la enfermedad y el manejo de la misma.

## CONCLUSIONES

La muerte descendente de árboles de durazno y ciruelo en el municipio de Zinapécuaro, Michoacán está asociada a la presencia del género *Armillaria*. Con base en el análisis de las secuencias de ADN se

it is recommended to continue further studies to find genetic disease resistance as well as improve disease management methods in the orchards.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Ing. Fortino Mendoza, Antonio Durán, Rafael Mendoza, Gerardo Mendoza and Jesús Guerrero for their help in conducting this study, and are grateful for the partial funding provided by Fondos Fiscales INIFAP Convocatoria 2015-2016, and SAGARPA/COFUPRO funds 2016 for the project “Generación de nuevas variedades de durazno en México” DF1600000799.

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

identifican dos aislados para Michoacán, diferentes a los aislados obtenidos en huertas de durazno en el Estado de México. Los aislados de *Armillaria* en Michoacán y Estado de México están relacionados genéticamente con *A. mellea*, el cual es considerado un patógeno agresivo. Actualmente, no se tienen identificados portainjertos tolerantes a *Armillaria*, se recomienda continuar con estudios de búsqueda de resistencia genética y manejo de la enfermedad en las huertas.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Fortino Mendoza, Antonio Durán, Rafael Mendoza, Gerardo Mendoza y Jesús Guerrero por todas las facilidades otorgadas para la realización de este estudio así como al Financiamiento parcial de Fondos Fiscales INIFAP Convocatoria 2015-2016, SAGARPA/COFUPRO Convocatoria 2016 en el Proyecto denominado: “Generación de nuevas variedades de durazno en México” DF1600000799.

LITERATURA CITADA

- Adaskaveg JE, Forster H, Wade L, Thompson DF and Connell JH. 1999. Efficacy of sodium tetrathiocarbonate and propiconazole in managing *Armillaria* root rot of almond on peach rootstock. *Plant Disease* 83:240–246. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1999.83.3.240>
- Aguín O, Mansilla P, Pintos C and Salinero MC. 1998. La podredumbre blanca de la raíz de la vid. *Vida Rural España* 47: 1-2. Disponible en línea: http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_vrural/Vrural_1998_72_46_47.pdf
- Aguín-Casal O, Mansilla-Vazquez JP and Sainz-Oses MJ. 2006. In vitro selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest Management Science*. 62, 223–228. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1149>
- Alvarado-Rosales D and Blanchette RA. 1994. *Armillaria* species from forests of central Mexico. *Phytopathology* 84:1106.
- Barnett LH and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 pp.
- Baumgartner K and Rizzo DM. 2001. Ecology of *Armillaria* species in mixed-hardwood forests of California. *Plant Disease* 85: 947–951. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.9.947>
- Baumgartner K. 2004. Root collar excavation for postinfection control of *Armillaria* root disease of grapevine. *Plant Disease* 88:1235–1240. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2004.88.11.1235>
- Brazeel NJ, Hulvey JP and Wick RL. 2011. Evaluation of partial *tefl1*, *rpb2*, and *nLSU* sequences for identification *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from northeastern North America. *Fungal Biology* 115, 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.05.008>
- Cai L, Giraud T, Zhang N, Begerow D, Cai G and Shivas RG. 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity* 50:121–133. Disponible en línea: http://max2.ese.u-psud.fr/publications/Cai_2011.pdf
- Cibrián TDD, Alvarado R y García SE (eds). 2007. Enfermedades Forestales de México/Forest Diseases in Mexico. Universidad Autónoma de Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NR-CAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO, Chapingo, México. 587 pp.
- Domsch KH, Gams W and Anderson TH. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press. Great Britain. 859 pp.
- Elías-Román RD, Guzmán-Plazola RA, Klopfenstein NB, Alvarado-Rosales D, Calderon-Zavala, G, Mora-Aguilera JA, Kim MS and García-Espinosa R. 2013. Incidence and phylogenetic analyses of *Armillaria* spp. associated with root disease in peach orchards in the State of Mexico, Mexico. *Forest Pathology* 43: 390-401. <http://dx.doi.org/10.1111/efp.12043>
- Fernández-Pavía SP, Gregorio-Cipriano R, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Mondragón-Flores A, Gómez-Dorantes N, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Fernández R y Herrera-Camacho J. 2015. Enfermedades de Especies Vegetales en México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México. 425 pp.
- Gubler WD. 1992. *Armillaria* root rot. In: *Grape Pest Management Edition 2 Publication #3343* (Flaherty, D.L., Christensen, L., Lanini, W.T., Marois, J.J., Phillips, P.A. and Wilson, L.T., eds), Oakland, CA: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 92-93 pp.
- Guo T, Wang HC, Xue WQ, Zhao J and Yang ZL. 2016. Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata*. *PLoS ONE* 11(5): e0154794. Disponible en línea: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0154794&type=printable>
- 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: <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Harrington TC, Worall JJ and Baker FA. 1992. *Armillaria*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press M.N. St. Paul. USA. 81 pp.
- Hasegawa E, Yuko O, Tsutomu H and Kikuchi T. 2010. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene. *Mycologia* 102: 898–910. <http://dx.doi.org/10.3852/09-238>
- Kim MS, Klopfenstein NB, Hanna JW and McDonald GI. 2006. Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers *Forest Pathology* 36:145–164. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00441.x>
- Klopfenstein NB, Hanna JW, Cannon PG, Medel-Ortiz R, Alvarado-Rosales D, Lorea-Hernández F, Elías-Román RD and Kim M.S. 2014. First report of the *Armillaria* root-disease pathogen, *Armillaria gallica*, associated with several woody hosts in three states of Mexico. *Plant Disease* 98:1280. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0349-PDN>
- Maphosa L, Wingfield BD, Coetzee MPA, Mwenje E and Wingfield MJ. 2006. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 35: 513-520. <https://doi.org/10.1071/AP06056>
- Rachel A. Koch RA, Wilson AW, Séné O, Henkel TW, and Aime MC. 2017. Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster*. *BMC Evolutionary Biology* 17:33. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0877-3>
- Redfern DB and Filip GM. 1991. Inoculum and infection. In: *Armillaria Root Disease Agriculture Handbook No. 691* (Shaw, C.G., III and Kile, G.A., eds), Washington, DC: United States Department of Agriculture Forest Service. 48-61 pp.
- Rivas-Valencia P y Fernández-Montes MR. 2017. Patrón espacial de muerte descendente de durazno ocasionada por *Armillaria* sp. en Michoacán. *Suplemento Revista Mexicana de Fitopatología Volumen 35: S128*. Disponible en línea: <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>

- Ross-Davis LA, Hanna WJ, Kim MS and Klopfenstein BN. 2012. Advances toward DNA-based identification and phylogeny of North American *Armillaria* species using elongation factor-1 alpha gene. *Mycoscience* 53:161–165. <https://doi.org/10.1007/s10267-011-0148-x>
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-25. Disponible en línea: <http://www.montefiore.ulg.ac.be/~lwh/IBIOINFO/Saitou-Nei-NJM-87.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Anuarios estadísticos de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). México, D. F. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (consulta: Enero, 2017).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta, 1980-2014 (SIACON). México. 2014. <http://www.gob.mx/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119> (consulta: Febrero, 2017).
- Steiner GW and Watson RD. 1965. Use for Surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology* 55: 728-730.
- Tamura K, Nei M and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 11030-5 DOI:10.1073/pnas.0404206101
- Valdés M, Córdova J, Valenzuela R y Fierros AM. 2004. Incremento del fitopatógeno *Armillaria mellea* (Vahl.:Fr.) Karsten en bosque de pino-encino, en relación al grado de disturbio por tratamiento silvícola. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10: 99-103. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62910205>
- Villaseñor GLE (editora). 2005. La biodiversidad en Michoacán: Estudio de Estado. 2005. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. Disponible en línea: http://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/pdf/EE_MICHOACAN_2005.pdf
- Worrall JJ. 1991. Media for selective isolation of hymenomycetes. *Mycologia* 83: 296-302. DOI:10.2307/3759989

Etiology of rotting of gladiolus corms in storage in Cautla, Morelos, Mexico

Etiología de la pudrición de cormos de gladiolo en almacén en Cautla Morelos, México

Areli Mitsyu Hernández-Moreno, Silvia Bautista-Baños, Mónica Hernández-López, Laura Leticia Barrera-Necha*, Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla km. 6, Colonia San Isidro, CEPROBI 8, C.P. 62531, Morelos, México; **Renato León-Rodríguez**, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Tercer circuito exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.; **Laura García-Barrera**, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac Tepetitla Km 1.5 Tepetitla, C.P. 90700, Tlaxcala, México. *Autor para correspondencia: lbarrera@ipn.mx.

Recibido: 16 de Marzo, 2017.

Aceptado: 03 de Agosto, 2017.

Hernández-Moreno AM, Bautista-Baños S, Hernández-López M, Barrera-Necha LL, León-Rodríguez R, García-Barrera L. 2017. Etiology of the rotting of gladiolus corms in storage in Cautla, Morelos, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 476-493.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-6

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 31, 2017.

Resumen. Las ventajas de México como productor florícola recaen en su diversidad de climas y su cercanía al mercado norteamericano. Actualmente la exportación de flores y plantas ha quedado consolidada, tal como es el caso del gladiolo al estar libre de arancel. Los principales estados productores son Puebla, Estado de México y Morelos. La producción comercial de la flor de corte de gladiolo se inicia a través de la plantación del cormo; el cual es afectado por diversos patógenos que ocasionan

Abstract. The advantages of Mexico as a floricultural producer lie in its diversity of climates and its proximity to the North American market. Currently the export of flowers and plants has been consolidated, gladiolus free of tariff. The main producing states are Puebla, State of Mexico and Morelos. Commercial production of the gladiolus cut flower is initiated through the planting of the corm; Which is affected by various pathogens that cause its rot, such as *Penicillium* that attacks during storage, causing limited root development and floral abortion. This causes infections through wounds and rupture sites; Is present in 90% of apparently healthy plant material. The objectives of this work were to isolate and to identify cultural, morphological and molecularly, as well as to realize tests of pathogenicity to determine the species of *Penicillium* that cause the rot. From the variety GrandPrix® corps (10/12) with different levels of morphological deterioration and according to visual hedonistic scale of seven-point. *P. verrucosum*

su pudrición, como los del género *Penicillium* que ataca durante el almacenamiento, provocando desarrollo limitado de raíces y aborto floral. Éste provoca infecciones a través de heridas y sitios de ruptura; se encuentra presente en un 90% de material vegetal aparentemente sano. Los objetivos de este trabajo fueron aislar e identificar cultural, morfológica y molecularmente, así como realizar pruebas de patogenicidad para determinar las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición. A partir de cormos variedad GrandPrix® (10/12) con diferentes niveles de deterioro morfológico y de acuerdo a una escala hedónica visual de siete puntos. Se aisló e identificó a *P. verrucosum* Dierckx y *P. rugulosum* Thom como causantes de la pudrición de cormos, este último reportado por primera vez como fitopatógeno en gladiolo.

Palabras claves: *Penicillium verrucosum*, *Penicillium rugulosum*, caracterización molecular, patógeno, caracterización cultural.

INTRODUCCIÓN

Por la diversidad de climas y cercanía al mercado estadounidense, México cuenta con un gran potencial como productor de flores; sin embargo, su floricultura ha sido catalogada como un sector de baja calidad y bajos niveles de productividad (Claridades Agropecuarias, 2006). La FUNPROVER (2008), menciona que México se sitúa en el quinto lugar con respecto a la superficie dedicada a la floricultura a nivel mundial y al realizar la comparativa de valor comercial, México es ampliamente superado por países como Colombia y Ecuador cuya superficie de cultivo no es menor; a pesar de esto durante el período 2000-2011 el valor de producción de flores en México, aumentó a una tasa media anual de 9.5% y alcanzó un valor de cinco mil 646 millones de pesos (DISEMINA, 2012).

Dierckx and *P. rugulosum* Thom were isolated and identified as the cause corm rot, the latter reported for the first time as a phytopathogen in gladiolus.

Key words: *Penicillium verrucosum*, *Penicillium rugulosum*, molecular characterization, pathogen, cultural characterization.

INTRODUCTION

Because of its diversity of climates and its proximity to the North American market, Mexico has a great potential as a producer of flowers; however, its flower production has been catalogued as a sector with low quality and productivity levels (Claridades Agropecuarias, 2006). FUNPROVER (2008) mentions that Mexico is fifth worldwide in terms of the surface dedicated to flower production, and when comparing commercial values, Mexico is widely surpassed by countries such as Colombia and Ecuador, the surfaces of which are not small. Regardless of this, in the period between 2000 and 2011, the value of Mexican flower production increased by an annual average of 9.5%, and reached a value of over 5.6 billion pesos (DISEMINA, 2012).

The main flower-producing states are the State of Mexico, Puebla, and Morelos, which provide 48, 22, and 12% of the country's production, respectively (CESAVEM, 2011). The economically important crops in the country are chrysanthemums, roses, carnations, and gladiolus. In terms of planted areas and demand, gladiolus is the main flower, since it adapts easily to technological (limited phytosanitary control, inadequate postharvest management) and weather limitations (extreme temperatures, high luminosity). In the state of Morelos, the crop is concentrated in the municipal areas of Cuautla, Yautepec, and Ayala.

Los principales estados productores de flor de corte son: el Estado de México, Puebla y Morelos, aportando el 48, 22 y 12% de la producción respectivamente (CESAVEM, 2011). Los cultivos de importancia económica a nivel nacional son: crisantemo, rosa, clavel y gladiola. En términos de área cultivada y demanda, la gladiola es la flor primordial, pues se adapta con facilidad a las limitantes tecnológicas (limitado control fitosanitario, mal manejo postcosecha) y climáticas (temperaturas extremas, alta luminosidad). En el estado de Morelos el cultivo se concentra en los municipios de Cuautla, Yautepec y Ayala.

La calidad de la gladiola, como flor de corte, depende en gran medida del cormo que es la estructura de reproducción vegetativa; los países especializados en su distribución son: Holanda, Francia, Chile y Estados Unidos (Claridades Agropecuarias, 2006). Los productores cuando requieren renovar el cultivar, acuden a casas comercializadoras o con productores de la misma zona para la adquisición del nuevo material. Sin embargo, la sanidad del cormo no es garantizada; enfrentando así una de las principales limitantes conocida como “pudrición del cormo” que es asociada a los hongos del género *Penicillium* (Pataky, 1983; González-Pérez *et al.*, 2009; IFBC, 2012).

En almacenamiento, el agente asociado a la pudrición del cormo en gladiola es *Penicillium gladioli*, descrito por McCulloch y Thom (1928); actualmente, existen reportes de otras especies de *Penicillium* que afectan los cormos por las que se estiman pérdidas del 50% en almacenamiento y del 15% en campo (Singh, 1970; González-Pérez *et al.*, 2009; González-Pérez, 2011). El presente estudio tuvo como objetivos: a) aislar y caracterizar cultural, morfológica y molecularmente las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición de cormos de gladiolo en almacenamiento y b) determinar la patogenicidad de los aislamientos de *Penicillium*.

The quality of the gladiolus, as a cut flower, depends largely on the corm, which is the plant reproductive structure. The countries specialized in its distribution are the Netherlands, France, Chile, and the United States (Claridades Agropecuarias, 2006). When farmers want to renew the cultivar they go to marketing venues or to farmers of the same area to acquire the new material. However, the health of the corm is not guaranteed, presenting one of the main limitations, known as “corm rotting,” which is related to fungi of the genus *Penicillium* (Pataky, 1983; González-Pérez *et al.*, 2009; IFBC, 2012).

In storage, the agent related to corm rotting in the gladiolus is *Penicillium gladioli*, described by McCulloch and Thom (1928). Currently, there are reports of other species of *Penicillium* that affect the corms, causing losses calculated in 50% in storage, and 15% on the field (Singh, 1970; González-Pérez *et al.*, 2009; González-Pérez, 2011). The aims of this study were a) to isolate and characterize culturally, morphologically, and molecularly the species of *Penicillium* that cause the rotting of gladiolus corms in storage, and b) to determine the pathogenicity of the isolations of *Penicillium*.

MATERIALS AND METHODS

Isolations

In August 2012, isolations were obtained from pathogenic fungi from GrandPrix commercial variety gladiolus corms, with a circumference of 10/12 cm (Grupo NederMex, S.A. de C.V. del Estado de México) that presented severe damage caused by *Penicillium*. In a laminar flow cabinet, the characteristic dust of this type of rotting was placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) medium and incubated for 10 d at 27 °C

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos

En agosto del 2012 se obtuvieron los aislamientos de los hongos fitopatógenos de cormos de gladiola comerciales variedad GrandPrix de circunferencia 10/12 cm (Grupo Nedermex, S.A. de C.V. del Estado de México) que presentaban daño severo ocasionado por *Penicillium*. En cámara de flujo laminar, el polvo característico de este tipo de pudrición se colocó en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) e incubó durante 10 d a 27 °C en oscuridad total. Las diversas colonias se aislaron, y purificaron hasta obtener cultivos monospóricos, en medio agar-agua por el método de dilución decimal seriada (Villanueva Arce *et al.*, 2005), se incubó en condiciones ambientales de laboratorio por 36 h. Algunas esporas germinadas se transfirieron a cajas de Petri con PDA. La conservación de cepas fúngicas se realizó con la técnica de silica-gel (Chan y Elander, 1986).

Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron cuatro cormos sanos por aislamiento, los cuales no presentaron daños visibles variedad GrandPrix 10/12, y cuatro más sin inocular como tratamiento testigo. Los cormos fueron despojados de la túnica, lavados con solución jabonosa y enjuagados con agua corriente. En campana de flujo laminar, los cormos se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 1.5% por 2 min, se enjuagaron con agua destilada estéril en tres ocasiones y colocaron sobre papel secante estéril contenido en charolas de poliestireno nuevas y desinfectadas. Una vez eliminada el agua superficial de los cormos, cada charola se dispuso en bolsas herméticas con cierre dentado. Los cormos se inocularon con cultivos de *Penicillium* de 10 d e

in complete darkness. The diverse cultures were isolated and purified until monosporic cultures were obtained in water-agar medium using the decimal serial dilution method (Villanueva Arce *et al.*, 2005), and incubated under environment conditions for 36 h. Some germinated spores were transferred to Petri dished with PDA. The fungal strains were conserved using the silica-gel technique (Chan and Elander, 1986).

Pathogenicity tests

Four healthy corms were used for every isolation, which presented no visible damages, of the variety GrandPrix 10/12, and four more without inoculating as a control treatment. The tunics were removed from the corms, which were washed with a soapy solution, and rinsed with tap water. In a laminar flow bell, the corms were disinfected with a sodium hypochlorite solution at 1.5% for 2 min, rinsed three times and placed on sterile drying paper contained in new and disinfected polystyrene trays. Once the surface water was discarded, each tray was placed in airtight bags with jagged zippers. The corms were inoculated with 10 d old *Penicillium* cultures and incubated for 8 d at 8 °C plus 22 d at room temperature. The inoculation methods used were two: by the infiltration of a suspension of spores following the method proposed by González-Pérez (2011), which consists in adjusting the suspension to a concentration of 1×10^5 spores mL^{-1} plus a Tween 20 aliquot, adjusting to a concentration of 0.1%. Later, 2 mL were infiltrated, one in the apical bud and another in the basal disc; by inoculation with mycelia, the latter was placed in an incision made with a hole puncher, 3 mm in diameter near the apical bud. The evaluation was based on a visual appreciation using a seven-point scale (Table 1). This evaluation was complemented by performing


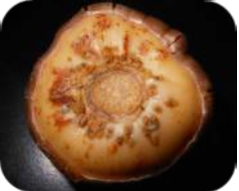

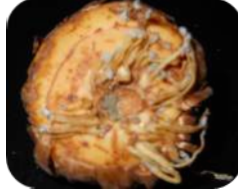



incubaron 8 d a 8 °C más 22 d a temperatura ambiente. Los métodos de inoculación utilizados fueron dos: por infiltración de suspensión de esporas siguiendo la metodología propuesta por González-Pérez (2011); que consiste en ajustar la suspensión a una concentración de 1×10^5 esporas mL^{-1} más una alícuota de Tween 20 ajustando a una concentración del 0.1%; se infiltraron 2 mL, uno en el brote apical y el otro en el disco basal; por inoculación con micelio, éste se colocó en una herida hecha con un sacabocados de 3 mm de diámetro cerca del brote apical. La evaluación se basó en una apreciación visual usando una escala de siete puntos (Cuadro 1). Esta evaluación se complementó realizando un

a vertical cut in the center of each corm. The total exposed surface of each half was measured in mm^2 along with the damaged surface with the aid of images and the program ImageJ (Rasband, 2006). Values were reported as a percentage of tissue affected in respect to the total area.

Cultural and morphological characterization

In malt extract agar (MEA) and czapek agar (Cz') we observed color, texture, exudates, and maximum culture growth from a saturated spore solution from the monosporic cultures as recommended by Frisvad and Samson (2004).

Cuadro 1. Escala de grado visual para el daño de *Penicillium* en cormos de gladiolo.
Table 1. Visual scale for the damage of *Penicillium* on gladiolus corms.

| | | | |
|---|---|--|--|
| 0 | 1 | 2 | 3 |
|  |  |  |  |
| Sin daño | Daño en menos del 60% en raíces. | Daño entre el 61-100% en raíces más 30% de infección en zona centro basal y manchas de color marrón en la periferia. | Daño en 100% de raíces, 31-80% de infección en la zona centro de la parte basal. Posible daño en la periferia. |
| 4 | 5 | 6 | |
|  |  |  | |
| Daño en el 100 % de la zona basal. Puntos color marrón bien delimitados. | Daño en el 100 % de la zona basal. Los puntos color marrón superan los 3 mm de diámetro | Zonas blandas | |

corte vertical en el centro de cada cormo; de cada mitad se midió la superficie expuesta total en mm² y la superficie dañada con la ayuda de imágenes y el programa ImageJ (Rasband, 2006); los valores se reportaron como porcentaje de tejido afectado con respecto al área total.

Caracterización cultural y morfológica

En extracto de malta agar (MEA) y agar czapek (Cz²) se apreció coloración, textura, exudados y máximo crecimiento de las colonias a partir de una solución de esporas saturada proveniente de los cultivos monospóricos como lo recomiendan Frisvad y Samson (2004). Para las mediciones morfométricas se establecieron microcámaras de crecimiento (Moreno *et al.*, 2005) a partir de las cuales se prepararon montajes para observar a detalle el micelio, conidióforos y conidios bajo microscopio compuesto (Olympus CX31, objetivo 40X). Las preparaciones se realizaron con lactofenol, midiendo en promedio 50 cuerpos fructíferos y 100 esporas por aislamiento. Se consideró longitud y ancho de estipe, métula y fiálide, y el diámetro del conidio; también se determinó forma, textura y patrón de ramificación del conidióforo. Para evaluar la tasa de crecimiento (TC), como característica fisiológica y diferencial entre especies, se utilizaron discos de 5 mm provenientes de los cultivos monospóricos de *Penicillium* para colocarlos en cajas de Petri de 50 mm de diámetro con PDA e incubó a temperatura ambiente hasta que el micelio alcanzó su máxima área de crecimiento. El crecimiento micelial consideró la evaluación de la máxima área diaria utilizando imágenes y el programa ImageJ (Rasband, 2006), finalmente se utilizó la siguiente ecuación para determinar la TC:

$$TC = \frac{\text{Crecimiento final} - \text{Crecimiento inicial}}{\text{Tiempo de incubación}}$$

For morphometric measurements, growth microchambers were set up (Moreno *et al.*, 2005), and from there, assemblies were prepared to observe the mycelium, conidophora, and conidia in retail under the compound microscope (Olympus CX31, lens 40X). The preparations were made with lactophenol, measuring an average of 50 fruit bodies and 100 spores per isolation. We considered the length and width of the stipe, metula, and phialide, as well as the diameter of the conidium; we also determined the shape, texture and ramification pattern of the conidiophore. To evaluate the growth rate (TC), as a physiological and differential characteristic between species, 5 mm discs from monosporic *Penicillium* cultures were used to place them in Petri dishes, 50 mm in diameter, with PDA, and incubated at room temperature until the mycelium reached its maximum growth area. Mycelial growth considered the evaluation of the maximum daily area using images and the program ImageJ (Rasband, 2006); finally, the following equation was used to determine the TC:

$$TC = \frac{\text{Final growth} - \text{Initial growth}}{\text{Time of incubation}}$$

The cultural and morphological characterization of each isolation was compared with the referent species obtained from molecular characterization using the taxonomic codes described by Frisvad and Samson (2004) and Pitt and Hocking (2009).

Extraction and purification of genomic DNA

Based on the protocol proposed by Doyle and Doyle (1990) with some modifications, in order to obtain the fungal mycelium PDA discs, 5 mm in diameter, from monosporic discs, were used to plant in 50 mL of potato dextrose broth

La caracterización cultural y morfológica de cada aislado se comparó con la especie referencia obtenida de la caracterización molecular utilizando las claves taxonómicas descritas por Frisvad y Samson (2004) y Pitt y Hocking (2009).

Extracción y purificación del ADN genómico

Con base en el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones; para obtener el micelio del hongo se usaron discos de PDA de 5 mm de diámetro, provenientes de cultivos monospóricos, para sembrar en 50 mL de medio caldo papa dextrosa el cual se incubó por 4 d a 27 °C. El micelio recuperado con papel filtro estéril, se maceró y trituró con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. En tubos Eppendorf, se agregó 0.2 g de micelio pulverizado más 600 mL de solución amortiguadora de lisis, se agitó en vortex e incubó 30 min a 65 °C en un termomezclador (Thermomixer Compact-Eppendorf®). A continuación, se adicionaron 250 mL de acetato de potasio 5 M y se agitó hasta homogeneizar en vortex y centrifugo; esta al igual que las subsecuentes se realizaron durante 5 min, 13000 rpm, 4 °C. El sobrenadante se recuperó y colocó en un tubo nuevo más un volumen de fenol:cloroformo: isoamilico (25:24:1 v/v/v), se mezcló y centrifugó. Recuperado nuevamente el sobrenadante en un tubo nuevo, se agregó 1 mL de RNAsa e incubó por 30 min a 37 °C. Pasados los 30 min, se adicionó un volumen de Cloroformo:Isoamilico (24:1 v/v), se mezcló y centrifugó. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, se adicionaron 2/3 de volumen de isopropanol frío, dejando reposar 2 h a -20 °C; posteriormente se centrifugo y eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1000 mL de etanol 70%, y se dejó secar hasta que se evaporó totalmente el alcohol. Las muestras se resuspendieron en 50 mL de agua destilada estéril y almacenaron a -20 °C. La

medium, which was incubated for 4 d at 27 °C. The mycelium recovered with sterile filter paper was macerated and crushed with liquid nitrogen in a porcelain mortar. In Eppendorf tubes, 0.2 g of pulverized mycelia were added along with 600 mL of lysis buffer solution, it was stirred in a vortex and incubated for 30 min at 65 °C in a thermomixer (Thermomixer Compact-Eppendorf®). Next, 250 mL of potassium acetate 5 M were added and stirred until homogenized in a vortex and a centrifuge. This one, as all the following, were carried out for 5 min, 13000 rpm, 4 °C. The supernatant was recovered and placed in a new tube with a volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v), then mixed and centrifuged. Once the supernatant was separated again and placed in a new tube, 1 mL of RNase was added and incubated for 30 min at 37 °C. After the 30 min, one volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1 v/v) was added, mixed and centrifuged. Once again, the supernatant was taken and placed in another tube, 2/3 volume of cold isopropanol were added, then left to rest for 2 h at -20 °C. It was then centrifuged and the supernatant was discarded. The pellet was washed with 1000 mL of ethanol at 70%, and left to dry until the alcohol evaporated completely. The samples were resuspended in 50 mL of sterile distilled water and stored at -20 °C. The purity of the DNA obtained was verified by electrophoresis in an agarose gel at 1% stained with 1 mL of GelRed 10,000x (0.1 mg mL⁻¹) and observed in a molecular photodocumenter (Imager®).

DNA Quantification

The DNA concentration was determined in the Nano Drop® (ND-1000), to later adjust to 50 ng mL⁻¹, as established by the method for quantification and sequencing.

pureza del ADN obtenido, se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con 1 mL de GelRed 10,000x (0.1 mg mL⁻¹) y se observó en un fotodocumentador molecular (Imager®).

Cuantificación del ADN

Se determinó la concentración del ADN en el Nano Drop® (ND-1000), para posteriormente ajustar a 50 ng mL⁻¹, como lo establece el método para la cuantificación y secuenciación.

Amplificación por PCR

Los iniciadores utilizados para amplificar la región ITS del ADN ribosomal fueron ITS1 con la secuencia 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' y el ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White *et al.*, 1990). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se realizó con un volumen final de la mezcla de 50 µL y se corrió en un termociclador (Bio Rad DNA engine®). La mezcla de reacción se compuso de: 5.0 µL de solución amortiguadora para la PCR, 3.0 µL de MgCl₂ (50 mM), 2.0 mL de la mezcla de dNTPs (10 mM), 1 mL de cada uno de los ITS's (50 pmol µL⁻¹) y 0.5 µL de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen® 94 kDa). El programa para la PCR (por sus siglas en inglés) consistió de 30 ciclos: desnaturalización inicial 95 °C por 5 min; desnaturalización 95 °C por 1 min; alineación a 57 °C por 40 s; extensión 72 °C por 1 min. Los fragmentos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 1 µL de GelRed 10, 000x (0.1 µg mL⁻¹) y comparados los pesos moleculares con el marcador TriDye 1kb DNA. Los productos de la PCR amplificados se purificaron mediante el kit GeneJet™ (Fermentas, USA).

Amplification by PCR

The primers used to amplify the ITS region of the ribosomal DNA were ITS1, with the sequence 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3', and ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White *et al.*, 1990). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out with a final volume of the mixture of 50 µL and run in a thermocycler (Bio Rad DNA engine®). The reaction mixture was composed of: 5.0 µL of buffer solution for the PCR, 3.0 µL of MgCl₂ (50 mM), 2.0 mL of the mixture of dNTPs (10 mM), 1 mL of each one of the ITS's (50 pmol µL⁻¹) and 0.5 µL of Taq-DNA polymerase (Invitrogen® 94 kDa). The program for the PCR consisted of 30 cycles: initial denaturalization 95 °C for 5 min; denaturalization 95 °C for 1 min; alignment at 57 °C for 40 s; extension 72 °C for 1 min. The amplified fragments were verified by gel electrophoresis in agarose gel at 1% stained with 1 µL of GelRed 10, 000x (0.1 µg mL⁻¹) and compared with the molecular weights with the marker TriDye 1kb DNA. The products of the amplified PCR were purified with the kit GeneJet™ (Fermentas, USA).

Sequencing

The DNA was quantified and sequenced in both ways to avoid assembly and comparison errors in the Institute of Biotechnology of the National Autonomous University of Mexico (Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México), Cuernavaca, Morelos. The sequences were aligned and compared with the National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información de Biotecnológica) using BLAST.

Secuenciación

El ADN se cuantificó y secuenció en ambos sentidos para evitar errores de ensamble y comparación; en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos. Las secuencias se alinearon y compararon con la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnológica mediante BLAST.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamientos

De los aislados que se obtuvieron de los cormos con síntomas de pudrición en almacén, se seleccionaron cuatro colonias representativas de *Penicillium* de acuerdo a su comportamiento cultural en PDA, las colonias se etiquetaron como 1P, 2P, 3P y 4P.

Pruebas de patogenicidad

La evaluación del porcentaje de superficie infectada y daño visual indicó que los cuatro aislados de *Penicillium*, inoculados en cormos de gladiolo variedad GrandPrix 10/12, fueron patogénicos con diferente grado de virulencia los aislados 1P y 4P fueron los más agresivos (Cuadro 2). Se observaron diferencias entre la inoculación por suspensión de esporas o micelio. El daño visual fue mayor en la inoculación con micelio. La evaluación de daño externo reportó necrosis de raíces de anclaje, manchas y hundimientos de color marrón, con presencia de micelio; aunque la presencia de micelio en raíces fue mayor. En general el daño interno mostró decoloración del tejido. En ambos casos, el hongo se reaisló y verificaron las características y el comportamiento cultural para cumplir con los postulados

RESULTS AND DISCUSSION

Isolations

Out of the isolations obtained from the corms with symptoms of rotting in storage, four cultures, representative of *Penicillium*, were selected according to their cultural behavior in PDA; the cultures were labeled as 1P, 2P, 3P, and 4P.

Pathogenicity tests

The evaluation of the percentage of the surface infected and of the visual damage indicated that the four *Penicillium* isolations, inoculated in gladiolus corms of the variety GrandPrix 10/12, were pathogenic with different degrees of virulence, and isolations 1P and 4P were the most aggressive (Table 2). Differences were noticed between inoculation of spores and of mycelia. Visual damage was greater in the inoculation with mycelia. The evaluation of external damage reported the necrosis of anchor roots, spots and brown-colored collapses, with the presence of mycelia, although the presence of mycelia was greater in roots. In general, internal damage presented tissue discoloring. In both cases, the fungus was reisolated and its characteristics and cultural behavior were verified to comply with the postulated by Koch. Despite the aggressiveness of *Penicillium* as a phytopathogen being considered low, the pathogenicity tests carried out in this study show that the infection level increases depending on the places with lesions and the natural rupture of the corm. González-Pérez *et al.* (2009) reported an isolation of *Penicillium* affecting the production area of Puebla with a aggressiveness that manifests itself in only 2.7% of the exposed area of the corms. The behavior of the isolations found in this investigation resemble descriptions by Overy *et al.* (2005), who point out that in their pathogenicity

Cuadro 2. Patogenicidad de cuatro aislados de *Penicillium* sp. en cormos de gladiola var. GrandPrix® 10/12.
Table 2. Pathogenicity of four *Penicillium* sp. isolations in gladiolus corms, var. GrandPrix® 10/12.

| Aislamiento | Suspensión de esporas | | Micelio | |
|-------------|---------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Superficie infectada % | Daño visual | Superficie infectada % | Daño visual |
| 1P | 37.3 ± 6.4 a ^x | 3.0 | 18.0 ± 10.4 bc | 3.5 |
| 2P | 30.9 ± 12.6 ab | 2.2 | 31.8 ± 11.0 ac | 2.7 |
| 3P | 23.5 ± 24.3 ab | 2.5 | 20.5 ± 4.3 bc | 3.0 |
| 4P | 28.0 ± 14.4 ab | 2.7 | 41.5 ± 22.3 a | 3.7 |
| Testigo | 9.4 ± 6.2 b | 0.7 | 29.5 ± 6.5b | 2.7 |

Valores con la misma letra representan valores estadísticamente iguales. Prueba de análisis de varianza de una vía con una $F = 4.206$, $F = 8.55$, gl (4, 35) y $P \leq 0.007$ determinada con comparación de medias por Tukey ($P \geq 0.05$). El valor mostrado en daño visual corresponde a la media / Values with the same letter represent statistically equal values. One-way test of analysis of variance with one $F = 4.206$, $F = 8.55$, gl (4, 35) y $P \leq 0.007$ determined with a Tukey comparison of averages ($P \geq 0.05$). The value shown for visual damage corresponds to the average.

de Koch. Aún cuando la agresividad de *Penicillium* como fitopatógeno es considerada baja; las pruebas de patogenicidad realizadas en este trabajo, muestran que el nivel de infección incrementa dependiendo de los sitios lesionados y ruptura natural del cormo. González-Pérez *et al.* (2009), reportaron un aislado de *Penicillium*, afectando la zona productora de Puebla cuya agresividad se manifiesta sólo en el 2.7% del área expuesta de los cormos. El comportamiento de los aislados encontrados en este trabajo se asemejan a lo descrito por Overy *et al.* (2005), quienes señalan que en sus pruebas de patogenicidad, los cormos presentaron moteado, decoloración externa, necrosis de raíces y en su caso, daño interno.

Caracterización cultural y morfológica de los aislamientos

El comportamiento cultural y las características morfológicas de los aislados de *Penicillium* se encuentran resumidas en los Cuadros 3 y 4; se observa que, las características descritas coinciden en la mayoría de los puntos referidos por la literatura para la especie reportada en la identificación molecular (Crous *et al.* 2004; Pitt y Hocking, 2009;

test, corms presented spots, external discoloring, root necrosis, and in their case, internal damage.

Cultural and morphological characterization of isolations

The cultural behavior and the morphological characteristics of the *Penicillium* isolations are summarized in Tables 3 and 4. We can observe that the characteristics described coincide with most of the points referred to by the bibliography for the species reported in the molecular identification (Crous *et al.* 2004; Pitt and Hocking, 2009; Frisvad and Samson, 2004). The morphological characteristics of the conidiophore and the behavior of the cultures in specific media have been acknowledged as the main taxonomic characteristics (Comerio, 2000). Figures 1, 2, 3, and 4 show the cultural behavior in media Cz', MEA, and PDA. Isolations 1P, 2P, and 4P belong to the same species *P. verrucosum*, although the cultural characteristics differ between isolation 1P and isolations 2P y 4P, probably considering the presence of two varieties, since they presented lower growth rates (.12 to .55 cm² d⁻¹) and this physiological characteristic helps separate

Cuadro 3. Comparación del comportamiento cultural y micromorfológico de aislados de *Penicillium* en cormos de gladiolo var. GrandPrix® en su tiempo de almacén con la especie de *P. verrucosum* (KC009832).
Table 3. Comparison of the cultural and micromorphologic behavior of *Penicillium* isolations in gladiolus var. GrandPrix® corms in their time of storage with the species *P. verrucosum* (KC009832).

| | | Cepa 1P | Cepa 2P | Cepa 4P | <i>P. verrucosum</i> ^x |
|------------------------------------|-----|--|--|---|--|
| TC cm ² d ⁻¹ | PDA | 2.159 | 0.555 | 0.120 | Nr |
| Diámetro (mm) | Cz | 32 | 25 | 27 | 15 – 25 |
| | MEA | 36 | 27 | 25 | 12 – 20 |
| Textura | Cz | Plano Aterciopelada | Aterciopelada ligeramente algodonoso y granular | Surcada y aterciopelada | De crecimiento limitado o esparciéndose ampliamente, textura aterciopelada a algodonosa o granular |
| | MEA | Aterciopelada algodonoso | Aterciopelado, centro con micelio aéreo y surcado | Sin y con centro abultado, surcado y granular a las orillas | Surcado, aterciopelado con centro algodonoso |
| Coloración | Cz | Verde grisáceo con margen blanco al centro | Verde opaco con micelio blanco | Verde con margen blanco estriado | Amarillo-verde, verde oscuro a gris, verde-azul, blanco u ocre |
| | MEA | Verde opaco y blanco | Amarillo, verde y blanco | Amarillo delimitado por margen blanco | Micelio blanco |
| Exudado | Cz | np | Np | Claro | Claro |
| | MEA | np | Np | Naranja | Ocasional, de color claro |
| Reverso | Cz | Centro marrón a pálido en las orillas | Beige, crema, centro oscuro | Marrón | Incoloro u amarillo, rosa, naranja o marrón |
| | MEA | Amarillo al centro, crema a las orillas | Amarillo claro | Amarillo | Marrón a café, amarillo u olivo |
| Forma del conidióforo | PDA | Monoverticillate y Tervorticillate | Monoverticillate, Bivorticillate y Tervorticillate | Tervorticillate | Bivorticillate y Tervorticillate |
| Estipe (µm) | PDA | 79.475±65.232 x 3.195 | 70.395 x 2.958 | 77.738 x 2.887 | 200 – 400 x 3.0 – 4.0 |
| Textura de Estipe | PDA | Rugosa | Rugosa | Rugosa | Rugosa |
| Métula (µm) | PDA | 13.679 x 2.746 | 10.762 x 2.664 | 10.935 x 2.656 | 8 – 13 x 3 – 4 |
| Forma de Métula | PDA | Cilíndrica | Cilíndrica | Cilíndrica | Cilíndrica |
| Fialide (µm) | PDA | 9.254 x 2.3 | 8.115 x 2.192 | 8.951 x 2.466 | 7.0 – 9.0 x 2.0 – 2.5 |
| Forma de la Fialide | PDA | Ampuliforme, con colula corta | Ampuliformes | Ampuliforme o lectiforme con colula corta | Ampuiforme |
| Conidia(µm) | PDA | 2 – 3 | 2 - 2.8 | 2 – 3 | 3.0 – 4.0 |
| Forma de conidias | PDA | Esféricas, emergiendo en cadenas ordenadas | Esféricas, emergiendo en cadenas ordenadas | Esféricas emergiendo en cadenas ordenadas | Esféricas o elipsoidales, en cadenas ordenadas |

Características en medio agar Czapek (Cz) y extracto de malta agar (MEA) a 25 °C 7 días en oscuridad. Presencia de exudados a 25 °C 14 días en oscuridad en medio Cz y MEA; Np: no presente; Nr: no reportado. Montajes en papa dextrosa agar (PDA), observaciones a 3 – 5 días en microscopio compuesto Olympus CX31, objetivo 40X. ^x Crous *et al.* 2004; Pitt y Hocking, 2009; Frisvad y Samson, 2004 / Characteristics in Czapek (Cz) agar medium and malt extract agar (MEA) at 25 °C 7 days in darkness. Presence of exudates at 25 °C 14 days in darknes in Cz medium and MEA; Np: not present; Nr: not reported. Mounted on potato dextrose agar (PDA), observations at 3 – 5 days under Olympus CX31 compound microscope, lens 40X. ^x Crous *et al.* 2004; Pitt and Hocking, 2009; Frisvad and Samson, 2004.

Cuadro 4. Comparación del comportamiento cultural y micromorfológico de aislados de *Penicillium* en cormos de gladiolo var. GrandPrix® en su tiempo de almacén con la especie de *P. rugulosum* (GU566230.1).
Table 4. Comparison of the cultural and micromorphologic behavior of *Penicillium* isolations in gladiolus var. GrandPrix® corms in their time of storage with the species *P. rugulosum* (GU566230.1).

| | | Cepa 3P | <i>P. rugulosum</i> ^x |
|------------------------------------|-----|--|---|
| TC cm ² d ⁻¹ | PDA | 0.794 | Nr |
| Diámetro (mm) | Cz | 11 – 60 | 4 – 8 – 12 |
| | MEA | 6 – 60 | 10 – 20 |
| Textura | Cz | Aterciopelada, ligeramente algodonosa | Aterciopelada |
| | MEA | Aterciopelada, plana | Aterciopelada |
| Coloración | Cz | Amarillo, beige, blanco | Usualmente blanco, se presenta también amarillo o rojo incrustado |
| | MEA | Amarillo, verde, blanco | Amarillo incrustado |
| Exudado | Cz | Np | Ausente o limitado |
| | MEA | Claro | Ausente o limitado |
| Reverso | Cz | Np | Pálido, verde-olivo opaco o café |
| | MEA | Amarillo pálido | Pálido, verde-olivo, opaco o café |
| Forma del conidióforo | PDA | Biverticillate, terverticillate | Biverticillate principalmente |
| Estipe (µm) | PDA | 78.775 x 2.506 | 70 – 100 |
| Textura de Estipe | PDA | Lisas o finamente rugosas | Paredes lisas |
| Métula (µm) | PDA | 9.168 x 2.003 | 10 – 15 |
| Forma de Métula | PDA | cilíndrica | |
| Fialide (µm) | PDA | 11.011 x 1.989 | 8 – 11 |
| Forma de la Fialide | PDA | Largas y ampuliformes | Ampuliformes o cilíndricas |
| Conidia (µm) | PDA | 1.6 – 2.6 | 2.5- 3.0 |
| Forma de conidias | PDA | Elipsoidal (limón) emergiendo en cadenas | Elipsoidal de pared suave o rugosa |

Características en medio agar Czapek (Cz) y extracto de malta agar (MEA) a 25 °C 7 días en oscuridad. Presencia de exudados a 25 °C 14 días en oscuridad en medio Cz y MEA; Np: no presente; Nr: no reportado. Montajes en papa dextrosa agar (PDA), observaciones a 3 – 5 días en microscopio compuesto Olympus CX31, objetivo 40X. ^xCrous *et al.* 2004; Pitt y Hocking, 2009; y Frisvad y Samson, 2004 / Characteristics in Czapek (Cz) agar medium and malt extract agar (MEA) at 25 °C 7 days in darkness. Presence of exudates at 25 °C 14 days in darknes in Cz medium and MEA; Np: not present; Nr: not reported. Mounted on potato dextrose agar (PDA), observations at 3 – 5 days under Olympus CX31 compound microscope, lens 40X. ^x Crous *et al.* 2004; Pitt and Hocking, 2009; Frisvad and Samson, 2004.

Frisvad y Samson, 2004). Las características morfológicas del conidióforo y el comportamiento de las colonias en medios específicos han sido reconocidas como carácter taxonómico primario (Comerio, 2000). En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se observa el comportamiento cultural en medio Cz', MEA y PDA. Los aislados 1P, 2P y 4P, pertenecen a la misma especie *P. verrucosum*; sin embargo, las

individuals of the same species. On the other hand, the ITS region and the subunit 5.8s of the rDNA used in this type of analyses are very preserved intraspecifically, and they are therefore not the most adequate to carry out studies of subspecific groups. Regarding isolation 3P, it belongs to the species *P. rugulosum*. The difference lies in the maximum growth of the culture. The bibliography

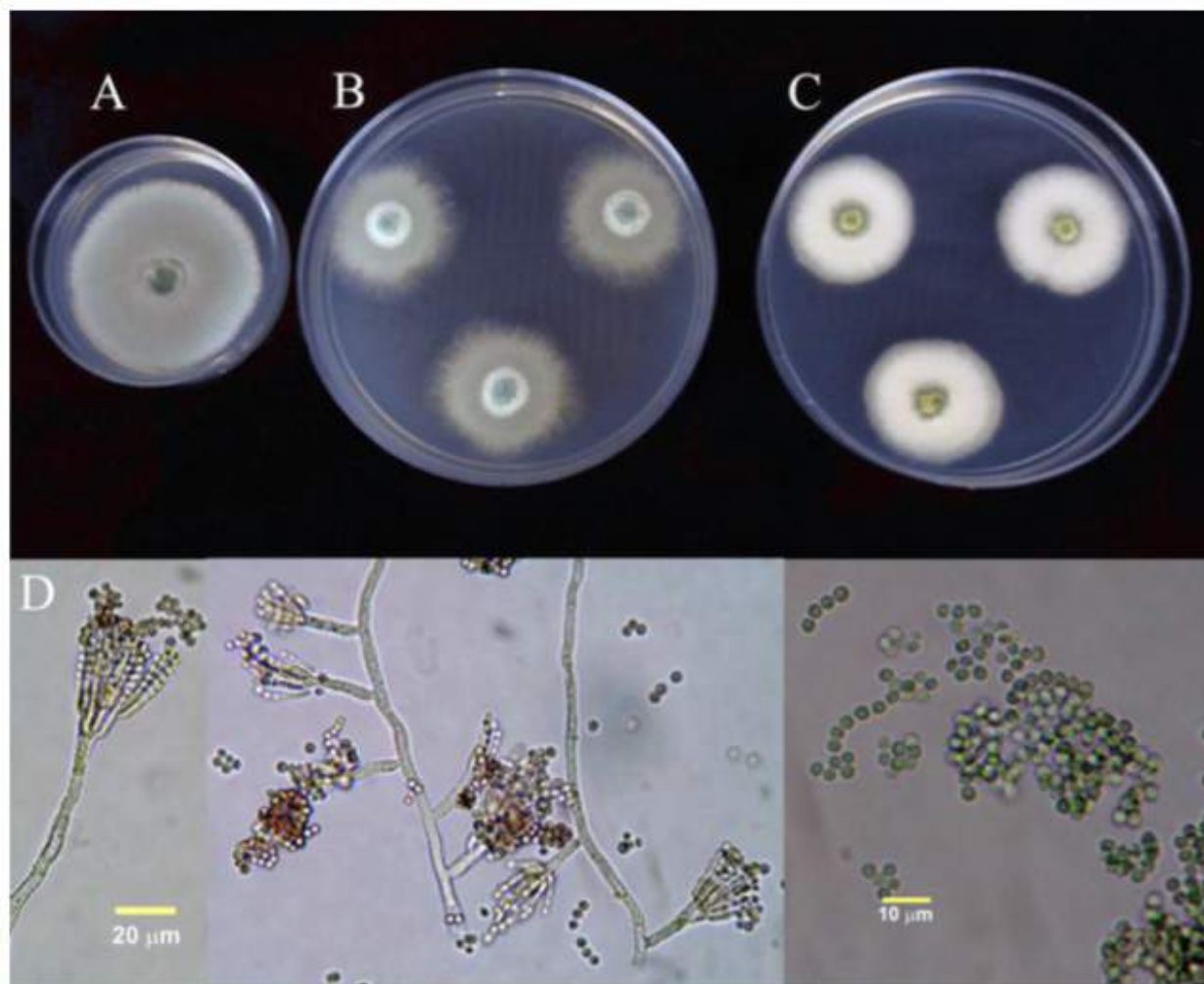


Figura 1. Colonias del aislado 1P identificado como *P. verrucosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

Figure 1. Cultures of isolate 1P identified as 7-day old *P. verrucosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

características culturales difieren entre el aislado 1P y los aislados 2P y 4P, considerándose probablemente la presencia de dos variedades debido a que presentaron tasas de crecimiento menores ($.12$ a $.55$ $\text{cm}^2 \text{d}^{-1}$) y esta característica fisiológica permite separar individuos de la misma especie. Por otra parte la región ITS y la subunidad 5.8s del ADNr utilizada en este tipo de análisis son muy conservadas intraespecíficamente por lo que no son las más adecuadas para estudiar grupos subespecíficos. Con

reports behavior characteristics for the reference species in a czapek yeast agar (CYA) medium and the medium used for this characterization was czapek agar medium (Cz'). However, the behavior displayed in malt extract agar (MEA), reported in the bibliography, also differs. Therefore, the use of culture media is not considered a part of the explanation in the discrepancy in the size of the cultures. This discrepancy may also be justified by the difference in growth rates.

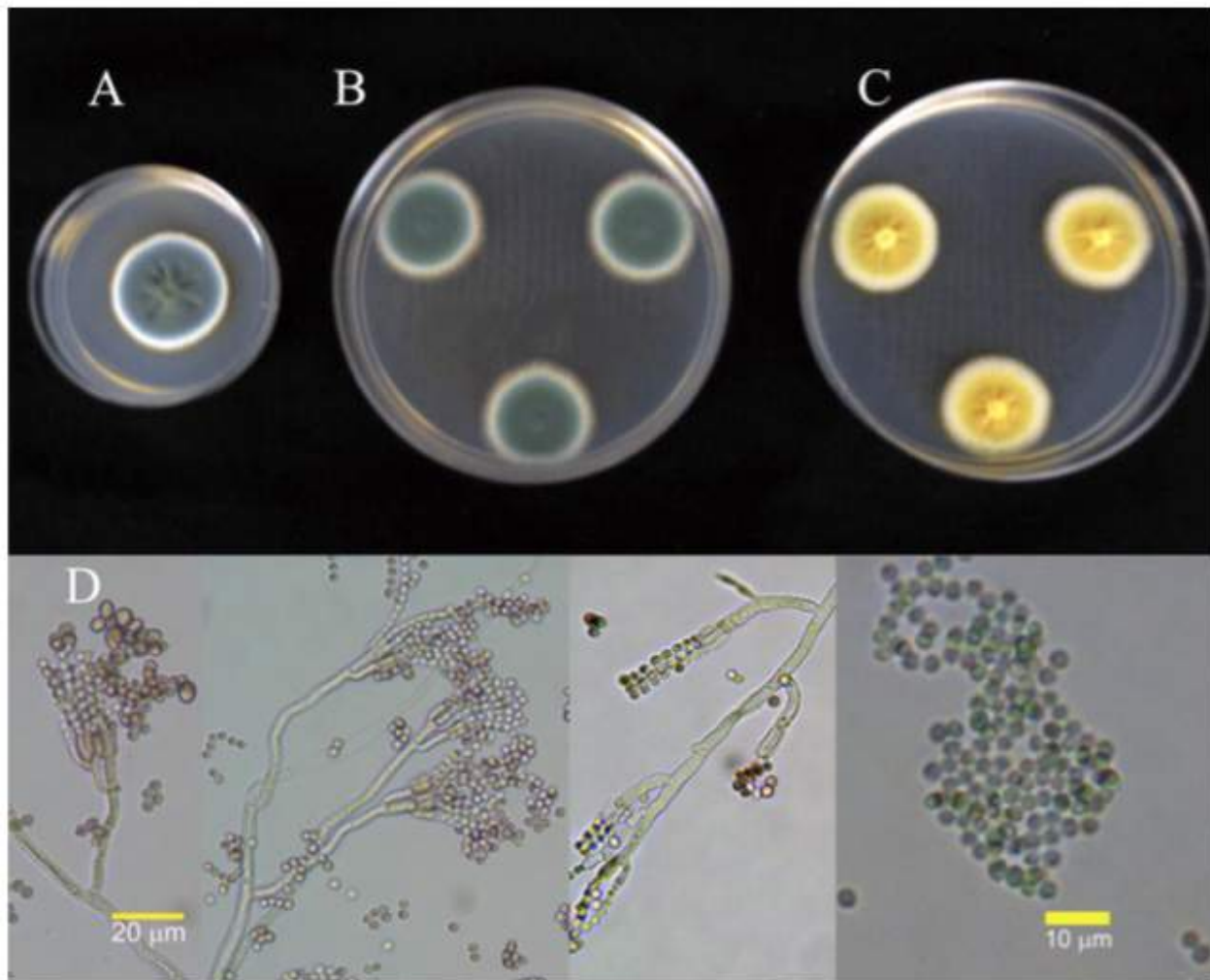


Figura 2. Colonias del aislado 2P identificado como *P. verrucosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

Figure 2. Cultures of isolate 2P identified as 7-day old *P. verrucosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

respecto al aislado 3P, pertenece a la especie de *P. rugulosum*, la diferencia se encuentra en el crecimiento máximo de la colonia. La literatura reporta características de comportamiento para la especie referencia en medio agar czapek extracto de levadura (CYA) y el medio usado para esta caracterización fue medio agar czapek (Cz'). Sin embargo, el comportamiento en extracto de malta agar (MEA), reportado en literatura, también difiere; por lo que

Molecular characterization of isolations

Table 5 shows the results of the amplification and sequencing in both directions of the rDNA of the four *Penicillium* isolations. This teste reported that the causal agents of the rotting of gladiolus agents in storage are *P. verrucosum* and *P. rugulosum*. Traditionally, this pathology is related to *P. gladioli* (McCulloch and Thom, 1928). However, Frisvad

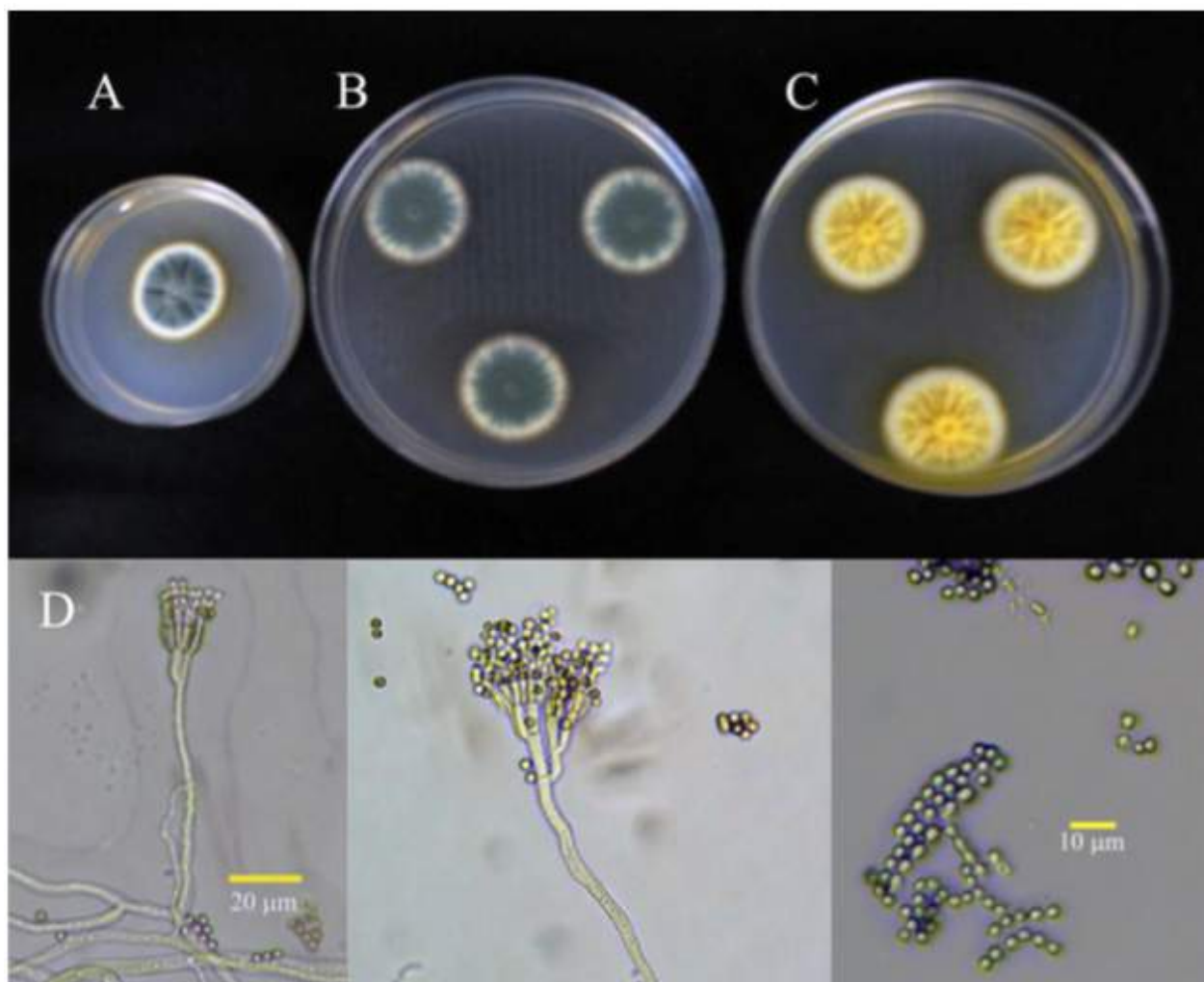


Figura 3. Colonias del aislado 4P identificado como *P. verrucosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

Figure 3. Cultures of isolate 4P identified as 7-day old *P. verrucosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

el uso de medios de cultivo no se considera como parte de la explicación en la discrepancia en el tamaño de las colonias. Esta discrepancia también puede justificarse por la diferencia en las tasas de crecimiento.

Caracterización molecular de los aislamientos

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la amplificación y secuenciación en ambos sentidos

and Samson (2004) mention that this species could be extinct due to the chemical management given to plants. On the other hand, there are reports of other species of *Penicillium* related to the rotting of gladiolus corms: *P. funiculosum* (Singh, 1970), *P. hirsutum*, *P. venetum* and *P. tulipae* (Overy *et al.*, 2005), *Penicillium* sp. (González-Pérez *et al.*, 2009) and *P. brevicompactum* (González-Pérez, 2011). Crous *et al.* (2004) mention in the mycobank database, that the species *P. verrucosum*,

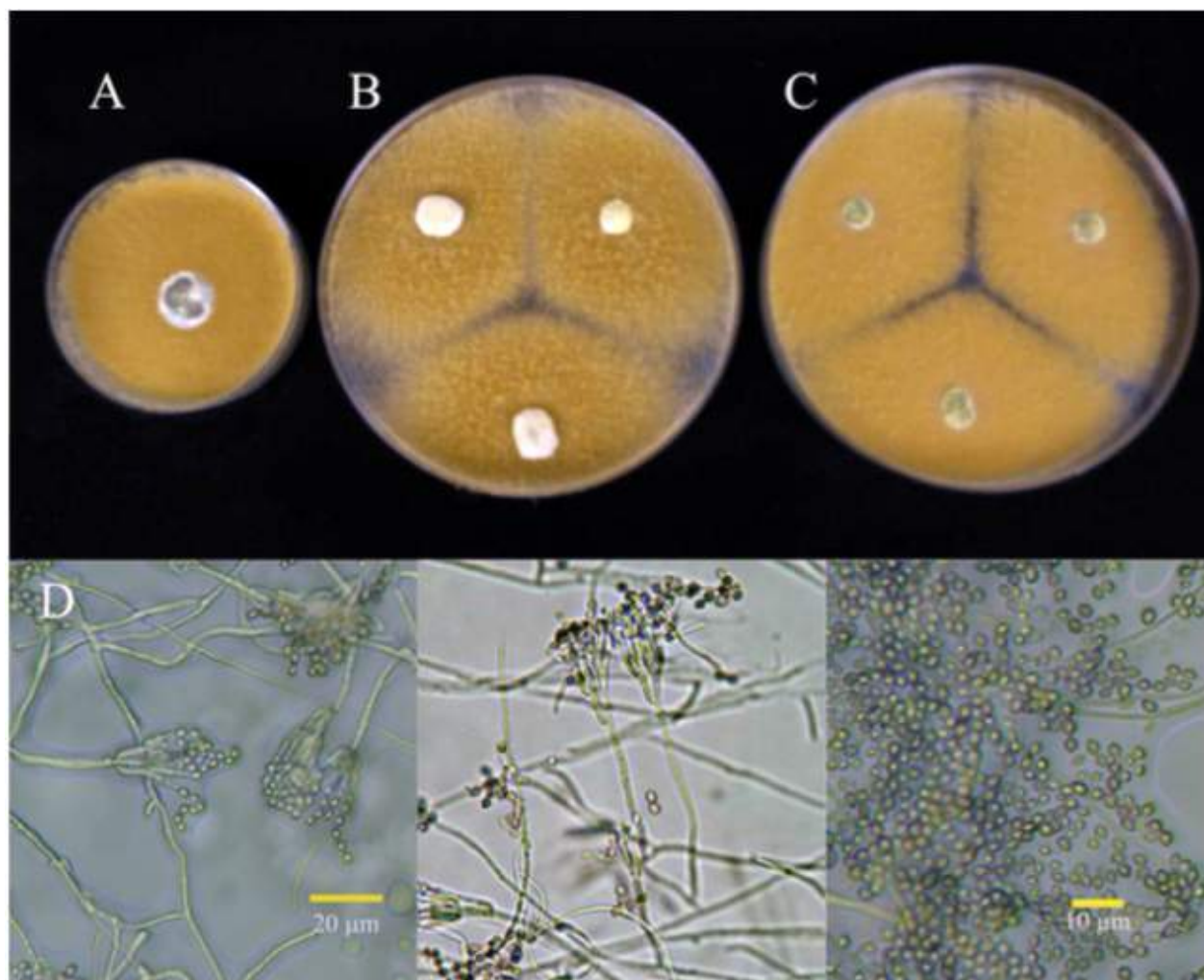


Figura 4. Colonias del aislado 3P identificado como *P. rugulosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz' y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

Figure 4. Cultures of isolation 3P identified as 7-day old *P. rugulosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz' and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

Cuadro 5. Identificación molecular de aislados de *Penicillium* en cormos de gladiolo var. Grand Prix® 10/12.

Table 5. Molecular identification of *Penicillium* isolations in gladiolus var. GrandPrix® corms 10/12.

| Aislado | Especie | Tamaño molecular | Porcentaje de identidad | No. de acceso al NCBI* |
|---------|------------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| 1P | <i>P. verrucosum</i> Dierckx | 522 | 100 | KC009832.1 |
| 2P | <i>P. verrucosum</i> Dierckx | 526 | 100 | KC009832.1 |
| 3P | <i>P. rugulosum</i> Thom | 529 | 100 | GU566230.1 |
| 4P | <i>P. verrucosum</i> Dierckx | 517 | 100 | KC009832.1 |

*NCBI: National Center for Biotechnology Information / NCBI: National Center for Biotechnology Information.

del ADNr de los cuatro aislados de *Penicillium*. Esta prueba reportó que los agentes causales de la pudrición de cormos de gladiolo en almacén son *P. verrucosum* y *P. rugulosum*. Tradicionalmente, esta patología es relacionada a *P. gladioli* (McCulloch y Thom, 1928). Sin embargo, Frisvad y Samson (2004) mencionan que esta especie puede estar extinta a causa del manejo químico que se da a las plantas. Por otro lado, existen reportes de otras especies de *Penicillium* asociadas a la pudrición del corno de gladiolo: *P. funiculosum* (Singh, 1970), *P. hirsutum*, *P. venetum* y *P. tulipae* (Overy *et al.*, 2005), *Penicillium* sp. (González-Pérez *et al.*, 2009) y *P. brevicompactum* (González-Pérez, 2011). Crous *et al.* (2004), mencionan en la base de datos mycobank, que la especie *P. verrucosum*, reportada en el análisis molecular, se encuentra relacionada con *P. hirsutum* y *P. verrucosum* var. *corymbiferum*, por lo que se asocia como uno de los principales agentes de pudrición de bulbos de flor (Chauhan y Saaltink, 1969; Smid *et al.*, 1995; Overy *et al.*, 2005). Por otro lado, *P. rugulosum* es conocida como una especie ampliamente distribuida; aislada de tejido enfermo o sano de diversos productos. Prince *et al.* (1988), aislaron esta especie de bulbos de Tulipan; sin embargo, hasta la fecha no se encuentran reportes de su presencia en cormos de gladiolo.

CONCLUSIONES

Penicillium verrucosum y *Penicillium rugulosum* se identificaron como agentes causales de la pudrición del corno de gladiolo durante almacenamiento. La primera especie identificada se consideró como la más agresiva en las pruebas de patogenicidad. *Penicillium rugulosum* es reportado por primera vez como un agente fitopatogénico para gladiola.

reported in the molecular analysis, is related to *P. hirsutum* and *P. verrucosum* var. *corymbiferum*, and therefore associated as being one of the main agents of the rotting of flower bulbs (Chauhan and Saaltink, 1969; Smid *et al.*, 1995; Overy *et al.*, 2005). On the other hand, *P. rugulosum* is known as a widely distributed species; isolated from diseased or healthy tissues of diverse products. Prince *et al.* (1988), isolated this species from tulip bulbs; however, to date there are no reports found of its presence in gladiolus corms.

CONCLUSIONS

Penicillium verrucosum and *Penicillium rugulosum* were identified as causal agents of rotting of the gladiolus corm during storage. The first species identified was considered the most aggressive in the pathogenicity tests. *Penicillium rugulosum* is reported for the first time as a phytopathogenic agent for gladiolus.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Polytechnic Institute (Instituto Politécnico Nacional - IPN) of Mexico for the financial support.

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

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (IPN) de México por el apoyo financiero.

## LITERATURA CITADA

- CESAVEM. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México. 2011. Manejo fitosanitario de ornamentales. Disponible en línea: <http://www.cesavem.org/?accion=ornamentales>
- Chang LT, Elander RP. 1986. Long-term preservation of industrially important microorganism. Manual of industrial Microbiology and Biotechnology. In: Demian AL, Solomon NA (eds). American Society for microbiology. USA. pp. 49-55. <http://doi.org/10.1002/food.19880320124>
- Chauhan SK, Saaltink GJ. 1969. A *Penicillium* attack on hyacinth bulbs as affected by temperature and humidity. Netherlands Journal of Plant Pathology 75: 197-204. <http://doi.org/10.1007/BF01981990>
- Claridades Agropecuarias. 2006. La floricultura mexicana, el gigante que está despertando. La Floricultura mexicana; flores de corte 154: 3-38. Disponible en línea: <http://www.infoasercia.gob.mx/claridades/revistas/154/ca154.pdf#page=3>
- Comerio RM. 2000. Nefrotoxinas y especies nefrotóxicas del género *Penicillium* Link. Revista Iberoamericana de Micología 17: 82 – 89. Disponible en línea: <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/082089.pdf>
- Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V and Stegehuis G. 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. Studies in Mycology 50: 19-22. Disponible en línea: <http://www.westerdijknstitute.nl/images/ResearchGroups/Phytopathology/pdf/PDF%20OP%20NUMMER/203.pdf>
- DISEMINA. Estadísticas del Sector Agroalimentario y Pesquero. 2012. La floricultura en México. Número 89. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Disponible en línea: [http://infosiap.siap.gob.mx/agricola\\_siap\\_gb/icultivo/](http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/icultivo/)
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15. Disponible en línea: <https://www.scienceopen.com/document?vid=6769c281-ab3f-4e1d-b01e-0414f9915561>
- Samson RA and Frisvad JC. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Pp: 1-174 p. In: Samson RA, Frisvad JC. (eds.). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. Studies in Mycology No. 49. Utrecht, The Netherlands. 251 p. Disponible en línea: [www.cbs.knaw.nl/publications/1049/voorwerk.pdf](http://www.cbs.knaw.nl/publications/1049/voorwerk.pdf)
- FUNPROVER. 2008. Cadena productiva de horticultura ornamental en el Estado de Veracruz. Disponible en línea: <http://www.funprover.org/formatos/PLANES%20ESTRATEGICOS/Cadena%20horticultura%20ornamental.pdf>
- González-Pérez E, Yáñez-Morales MJ, Ortega-Escobar HM, Velázquez-Mendoza J. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 27:45-52. Disponible en línea: <http://scielo.unam.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a6.pdf>
- González-Pérez E. 2011. Fenología, propagación *In vitro* y enfermedades del gladiolo en San Martín Texmelucan, Puebla. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Producción de Semillas. Montecí-llos, Texcoco, Edo. de México. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/10521/598>
- IFBC. International Flower Bulb Centre. 2012. Gladiolus as cut flowers. Guidelines for cut flower production. Disponible en línea: <http://edepot.wur.nl/167428>
- McCulloch L and Thom C. 1928. A rot of gladiolus corms caused by *Penicillium gladioli*, McC. and Thom. Journal of Agricultural Research 36:217-224. <http://doi.org/10.1126/science.67.1730.216-a>
- Moreno VM, Yáñez MMJ, Rojas MRI, Zavaleta ME, Trinidad SA. 2005. Diversidad de Hongos en Semilla de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su Caracterización molecular. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 111-118. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223201.pdf>
- Overy DP, Karlshj K and Due MJ. 2005b. Low temperature growth and enzyme production in *Penicillium* ser. *Corymbifera* species, casual agents of blue mold storage rot in bulbs. Journal of Plant Pathology 87: 57- 63. <http://doi.org/10.1139/b05-110>
- Pataky NR. 1983. Gladiolus corm rots. University of Illinois. Extension. Report on plant disease. RPD No. 651. 6 p. Disponible en línea: <https://ipm.illinois.edu/diseases>
- Pitt JI and Hocking AD. 2009. Fungi and Food Spoilage. Third Edition. Springer. Pp. 169-273. [http://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2\\_7](http://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_7)
- Prince TA, Stephens Ct and Herner RC. 1988. Pathogenicity, fungicide resistance, and ethylene production of *Penicillium* spp. isolated from tulip bulbs. Phytopathology 78: 682-686. <http://doi.org/10.1094/Phyto-78-682>.
- Rasband W. 2006. ImageJ for microscopy. Image processing and analysis in Java. Disponible en línea: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>
- Singh RN. 1970. *Penicillium* rots of gladiolus in India. Plant and Soil 33: 249-250. <http://doi.org/10.1007/BF01378215>
- Smid EJ, de Witte Y and Gorris LGM. 1995. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. Postharvest Biology and Technology 6: 303-312. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00010-4](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00010-4)
- Villanueva-Arce, R., A. M. Hernández-Anguiano, M. J. Yáñez-Morales, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, E. Cárdenas-Soriano, y A. Castañeda-Vildózola. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. Agrociencia 39: 93-106. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239109>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (eds.). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press. Pp. 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

# Reduction in the incidence of grey mold in table grapes due to the volatile effect of a garlic extract

## Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto de volátiles de un extracto de ajo

Paola Campa-Siqueiros, Socorro Vallejo-Cohen, Consuelo Corrales-Maldonado, Miguel Ángel Martínez-Téllez, Irasema Vargas-Arispuro\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria km 0.6, C.P. 83304 Hermosillo, Sonora; Graciela Ávila-Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia y Ecología, Periférico Francisco R. Almada Km 1, Zootecnia, C.P. 31453, Chihuahua, Chihuahua. \*Autor para correspondencia: iris@ciad.mx.

Recibido: 12 de Julio, 2017.

Aceptado: 21 de Agosto, 2017.

Campa-Siqueiros P, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C, Martínez-Téllez MA, Vargas-Arispuro I, Ávila-Quezada G. 2017. Reduction in the incidence of grey mold in table grapes due to the volatile effect of a garlic extract. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 494-508.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-1

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 31, 2017.

**Resumen.** La pudrición gris en racimos de uva causada por *Botrytis cinerea*, es la enfermedad que más afectan al mercado de la uva de mesa. Su control es mediante almohadillas liberadoras de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y fungicidas sistémicos, actualmente en revisión regulatoria. En este trabajo se planteó evaluar en forma volátil un extracto de ajo (EHA), alicina, dialildisulfuro (DADS) y dialiltrisulfuro (DATS), sobre la incidencia de pudrición gris en racimos de uva variedad Flame seedless. Los tratamientos fueron impregnados en celulosa, que permitió la liberación de los compuestos sobre

**Abstract.** Gray mold in grape clusters caused by *Botrytis cinerea*, is one of the diseases that most affect the table grape market. To control this disease sulphur dioxide releasing pads (SO<sub>2</sub>) and systemic fungicides are used, currently in regulatory review. In this work, it was proposed to use an extract of garlic (EHA), allicin, dialyldisulfide (DADS) and dialyltrisulfide (DATS) in volatile form to evaluate the incidence of gray mold on clusters of table grapes of the Flame seedless variety. Treatments were impregnated with cellulose, which allowed the release of the volatile compounds on clusters of grape inoculated with 1x10<sup>6</sup> spores of *B. cinerea*/mL. The results showed that the volatile emitted by allicin and DADS had a lower effect than that of EHA and DATS. Those compounds similarly inhibited (P≤0.05) disease development in clusters of grape for 14 days at 4 and 25 °C, showing increased effectiveness at low temperature (4 °C). This is a result of particular relevance in the problematic of this disease that occurs during grape cold storage. The effectiveness of garlic-derived

los racimos de uva inoculados con  $1 \times 10^6$  esporas de *B. cinerea*/mL. Los resultados mostraron que los volátiles emitidos por alicina y DADS tienen menor efecto que el EHA y DATS, los cuales inhibieron de manera similar ( $P \leq 0.05$ ) el desarrollo de la enfermedad en los racimos durante 14 días a 4 y 25 °C, presentando mejor efectividad a bajas temperatura (4 °C). Resultado de particular relevancia en la problemática de esta enfermedad, que se presenta durante el almacenamiento en frío de la uva. La efectividad mostrada por los compuestos derivados de ajo, aplicados en su forma volátil, abre la posibilidad de su utilización como una alternativa a los fungicidas tradicionales para el control de enfermedades postcosecha.

**Palabras clave:** *Vitis vinifera*, *Allium sativum*, pudrición de racimos, volátiles azufrados.

Entre los hongos patógenos que afectan el cultivo de la uva de mesa, destaca *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.[teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (Bary) Whetz.], ascomiceto causante de la pudrición gris. Este hongo afecta la producción de uva de mesa, tanto en la etapa de pre-cosecha como en post-cosecha, en un amplio rango de condiciones ambientales y de áreas geográficas (Williamson *et al.*, 2007). El desarrollo de la pudrición gris durante la etapa de comercialización de la uva de mesa, afecta el valor de la fruta en el mercado, y es motivo de rechazo en el momento de revisión en las fronteras de los países importadores. Las condiciones de temperatura y humedad durante el transporte y/o almacenamiento en frío, favorecen el desarrollo de *B. cinerea*, ya que durante estas etapas la fruta alcanza su máxima concentración de azúcar, permitiendo que el hongo crezca vigorosamente, propagándose con facilidad entre los racimos de uva (Lichter *et al.*, 2006). En el Noroeste de México el

compuestos aplicados en su forma volátil abre la posibilidad de usarlos como una alternativa a los fungicidas tradicionales para controlar enfermedades post-cosecha.

**Key words:** *Vitis vinifera*, *Allium sativum*, cluster rot disease, sulphur volatile.

*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.[teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (Bary) Whetz.], the ascomycete that causes gray mold, is one of the most important fungal plant pathogens affecting table grapes. The fungus affects table grapes production both in pre-harvest and post-harvest stages in a wide range of environment conditions and geographic areas (Williamson *et al.*, 2007). Development of gray mold on table grapes affects their market value and also causes them to be rejected upon being inspected at the borders of importing countries. Temperature and moisture conditions during transportation and/or cold storage favor the development of *B. cinerea*, because during these stages berries achieve their maximum sugar concentration allowing the fungus to grow vigorously and spread easily among grape clusters (Lichter *et al.*, 2006). In northwestern Mexico, 90% of table grape production is exported to markets in the United States, Europe and Asia. To reach those markets, they are sent in refrigerated ( $4 \pm 1$  °C) containers over land or sea and have to withstand journeys of 14-25 days (Vázquez, 2011; Lichter *et al.*, 2008).

A common method to control gray mold on table grapes during transportation and cold storage is the use of sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) releasing pads; SO<sub>2</sub> is a gaseous compound that disperses inside the container and prevents *B. cinerea* spores to germinate (Sanzani *et al.*, 2012). However, SO<sub>2</sub> damages the berries by bleaching (Milkota *et al.*,

90% de la producción de uva de mesa es exportada a mercados de Estados Unidos, Europa y Asia. Para poder alcanzar estos mercados, la fruta es enviada en contenedores refrigerados ( $4\pm 1$  °C), tanto por tierra como por mar, debiendo soportar entre 14-25 días de transporte (Vázquez, 2011; Lichter *et al.*, 2008).

El control de la pudrición gris bajo condiciones de transporte y almacenamiento en frío de uva de mesa, es mediante el uso de almohadillas liberadoras de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), compuesto gaseoso que se difunde en el espacio del contenedor, impidiendo la germinación de las esporas del hongo (Sanzani *et al.*, 2012). El uso de SO<sub>2</sub> ocasiona blanqueamiento de las bayas (Milkota *et al.*, 2010) y puede provocar reacciones de hipersensibilidad en consumidores (Ruiz-Moreno *et al.*, 2015). Por estos motivos y aunado a la importancia comercial de la exportación de uva de mesa, se han hecho esfuerzos por encontrar alternativas al uso de SO<sub>2</sub>. De las diversas alternativas que se han presentado, las más aceptadas han sido aquellas, donde el componente activo proviene de origen natural (Tripathi *et al.*, 2008). Entre las alternativas naturales, los compuestos de ajo han demostrado tener efecto fungicida (Perelló *et al.*, 2013; Wallock-Richards *et al.*, 2014). Particularmente, se ha atribuido esta bioactividad al compuesto alicina (Curtis *et al.*, 2004), el cual es uno de los componentes más abundantes que se forma cuando el ajo es dañado mecánicamente. Otros compuestos azufrados derivados de ajo que también han demostrado tener efecto antifúngico son dialildisulfuro (DADS) y dialiltrisulfuro (DATS) (Tsao and Yin, 2001; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015). Una cualidad que hace atractivo el uso de los compuestos azufrados derivados de ajo, es su característica de ser volátiles, permitiéndoles tener bioactividad en la fase de vapor, facilitando la

2010) and may produce hypersensitivity reactions in consumers (Ruiz-Moreno *et al.*, 2015). For this reason, besides the commercial importance of table grape exports, efforts have been made to find alternatives to using SO<sub>2</sub>. From the various alternatives considered, the most accepted have been those whose active component comes from natural sources (Tripathi *et al.*, 2008). From natural sources, garlic compounds have shown fungicidal effect (Perelló *et al.*, 2013; Wallock-Richards *et al.*, 2014). Such bioactivity has been especially attributed to the allicin compound (Curtis *et al.*, 2004), one of the most abundant components formed when garlic is mechanically damaged. Other sulphur compounds derived from garlic that have also shown antifungal effects are diallyl disulfide (DADS) and diallyltrisulfide (DATS) (Tsao and Yin, 2001; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015). A particularly attractive feature of sulphur compounds derived from garlic is that they are volatile. This characteristic allows them to have bioactivity at vapor phase and makes it easier to use them in a gaseous form to control diseases. This is a relevant aspect of table grape marketing because, after being harvested, the berries must not be in contact with liquid substances (Codex Stan 255, 2007). In a previous research, it was found that a hydroalcoholic extract of garlic (EHA) inhibited *B. cinerea in vitro* spore germination in a magnitude similar to that of allicin and diallyltrisulfide compounds (Gándara-Ledezma *et al.*, 2015).

Considering all the aspects above mentioned, this research focused on evaluating the effect of the volatile compounds from a hydroalcoholic extract of garlic, allicin, diallyl disulfide and diallyltrisulfide on the incidence of gray mold on table grapes inoculated with *B. cinerea* at transportation (4 °C) and marketing temperature (25 °C).

posibilidad de utilizarlos en forma gaseosa para el control de enfermedades. Este aspecto se hace relevante para la comercialización de la uva de mesa, donde la fruta después de su cosecha no debe entrar en contacto con sustancias líquidas (Codex Stan 255, 2007). En un trabajo previo se encontró que un extracto hidroalcohólico de ajo (EHA) fue capaz de inhibir *in vitro* la germinación de esporas de *B. cinerea*, en una magnitud similar a los compuestos alicina y dialiltrisulfuro (Gándara-Ledezma *et al.*, 2015).

Tomando en consideración todos los aspectos antes mencionados, este trabajo se centró en evaluar el efecto de los compuestos volátiles emitidos por un extracto hidroalcohólico de ajo, alicina, dialildisulfuro y dialiltrisulfuro sobre la incidencia de la pudrición gris en racimos de uva de mesa inoculadas con *B. cinerea*, evaluados a la temperatura de transporte (4 °C) y de comercialización (25 °C).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Botrytis cinerea* Pears

*Botrytis cinerea* se aisló de uvas infectadas variedad Flame seedless de un campo ubicado en la zona vitícola de Pesqueira, Sonora. La cepa se identificó por las características morfológicas y moleculares, tales como tamaño de los conidios, apariencia de la colonia y por la secuencia del ITS1-5.8S RNA-ITS2 (acceso AY568636). Para su crecimiento se utilizó como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se mantuvo a 25 °C de 7 a 9 días en oscuridad (Tzortzakis *et al.*, 2007). El hongo se sembró tomando un pequeño pedazo de micelio e inoculándolo sobre PDA a 25 °C de 7 a 9 días o hasta que el hongo alcanzó una esporulación suficiente para preparar una solución de  $1 \times 10^6$

## MATERIALS AND METHODS

### *Botrytis cinerea* Pears

*Botrytis cinerea* was isolated from infected grapes of the Flame Seedless variety in a vineyard located in the wine region of Pesqueira, Sonora. The strain was identified by its morphological and molecular characteristics such as conidia size, colony appearance and ITS1-5.8S RNA-ITS2 sequence (access AY568636). For growth, it was sown in agar-potato-dextrose (PDA) medium culture and kept in darkness at 25 °C from 7 to 9 days (Tzortzakis *et al.*, 2007). The fungus was sown again by taking a piece of mycelium and inoculating it into PDA at 25 °C from 7 to 9 days, or until the fungus produced enough spores to prepare a  $1 \times 10^6$  spore/mL suspension. To prepare the suspension, 5 mL of distilled water with 0.01% of 0.02% Tween 80 were poured on the surface of the plate containing the fungus; then, it was scratched using a glass rod, the liquid containing fungal spores was collected and filtered through muslin cloth to remove the mycelium, and the mixture was centrifuged at 5000 x g. The collected spores were re-suspended in sterile water until a  $1 \times 10^6$  spores/mL concentration was obtained, and quantified in a Neubauer chamber, according to the methodology of Moo-Koh *et al.* (2014).

### **Hydroalcoholic extract of garlic (EHA) and its derived sulphur compounds (DADS, DATS and allicin)**

The extract was prepared using garlic of the Regional variety purchased at the local market. Ten gram of garlic cloves were blended with 14 mL of distilled water for 1 min at room temperature. The mixture was centrifuged at 15 000 x g at 4 °C for

esporas/mL. La suspensión de esporas se preparó adicionando 5 mL de agua destilada conteniendo 0.01% de Tween 80 al 0.02% sobre la superficie de la placa con el hongo, se raspó con una varilla de vidrio, el líquido conteniendo las esporas del hongo se colectó y filtró sobre gaza para eliminar micelio y el filtrado fue centrifugado a 5000 x g. Las esporas colectadas fueron resuspendidas en agua estéril hasta lograr una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL cuantificadas con un cámara de Neubauer de acuerdo con la metodología de Moo-Koh *et al.* (2014).

#### **Extracto hidroalcohólico de ajo (EHA) y sus compuestos derivados azufrados (DADS, DATS y alicina)**

El extracto se preparó a partir de ajo de la variedad “regional”, adquirido en el mercado local. Diez gramos de dientes de ajo, se licuaron con 14 mL de agua destilada durante 1 min a temperatura ambiente. El homogenado se centrifugó por 20 minutos a  $15\,000 \times g$  a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , se adicionaron 6 mL de etanol al sobrenadante y se centrifugó nuevamente a  $8000 \times g$  por 20 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  (Jansen *et al.*, 1987). El sobrenadante representó el extracto hidroalcohólico de ajo. Los estándares con pureza por encima del 98% de alicina, dialil disulfuro (DADS) y dialil trisulfuro (DTS) se adquirieron en Neem Biotech (Cardiff, UK).

#### **Evaluación *in vitro* del efecto de EHA, DADS, DATS y Alicina en el desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva**

Los racimos de uvas de la variedad Flame seedless se recolectaron al momento de la cosecha en viñedos de la región de Pesqueira, Sonora. Los

20 min, then 6 mL of ethanol were added to the supernatant and the mixture was centrifuged again at  $8000 \times g$  at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  for 20 min (Jansen *et al.*, 1987). The supernatant represented the hydroalcoholic extract of garlic. Standards with purity above 98% alliin, dialyldisulfide (DADS) and dialyltrisulfide (DTS) were purchased from Neem Biotech (Cardiff, UK).

#### ***In vitro* evaluation of the effect of EHA, DADS, DATS and alliin on gray mold development caused by *Botrytis cinerea* on grape clusters**

Grape clusters of the Flame Seedless variety were collected at harvest in vineyards in the wine region of Pesqueira, Sonora. The clusters were reduced to 10 berries per cluster, ensuring that they did not show visible symptoms of gray mold caused by *B. cinerea*. The clusters were disinfected by immersion in a 2% (v/v) sodium hypochlorite solution for 5 min, rinsed with sterile distilled water and dried on paper towels at room temperature. A puncture wound near the peduncle of each berry was made with a sterile scalpel. Each cluster was sprayed with 1 mL of the  $1 \times 10^6$  spores/mL suspension of *B. cinerea* prepared in dextrose sabouraud agar (CDS). The inoculated clusters were placed in  $50\text{ cm}^3$  plastic chambers (one cluster per chamber) and exposed to volatile compounds from EHA, DADS, DATS and alliin at the doses per treatment shown in Table 1. The compounds were impregnated in cellulose pads (6x2 cm) that had been previously stuck on the coverlid of the chambers. The control treatment was impregnated with a water-glycerol solution because glycerol was used as a retention agent to control the release of the emitter's volatiles. This compound was incorporated into the treatments before impregnating the emitter. The disease

racimos se llevaron a 10 bayas por racimo, asegurándose que no presentaran síntomas visibles de pudrición gris causada por *B. cinerea*. Los racimos se desinfectaron sumergiéndolos durante 5 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v), posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente a temperatura ambiente. A cada una de las bayas, se les hizo una herida por punción cerca del pedúnculo con un bisturí estéril. Después se asperjó sobre cada racimo 1 mL de la suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *B. cinerea* preparadas en caldo dextrosa sabouraud (CDS). Los racimos inoculados se colocaron en cámaras de plástico de 50 cm<sup>3</sup> (un racimo por cámara). Los racimos de uva se expusieron a los compuestos volátiles emitidos por el EHA, así como a los compuestos puros de DADS, DATS y alicina a las dosis que se muestran en los tratamientos que se presentan en el Cuadro 1. Los compuestos se impregnaron en almohadillas de celulosa (6 x 2 cm) previamente pegadas sobre la tapa de las cámaras. El tratamiento control consistió en la impregnación de una solución de agua-glicerol (1:2 v/v), ya que el glicerol fue utilizado como agente de retención, para controlar la liberación de los volátiles del emisor. Este compuesto fue incorporado a los tratamientos antes de la impregnación al emisor. La incidencia de la enfermedad se cuantificó cada dos días durante un lapso de 14 días, a 4 y 25 °C. Se cuantificaron el número de bayas de cada racimo con presencia de pudrición gris. Los resultados se presentan como incidencia de la enfermedad (porcentaje de bayas infectadas), calculada con la fórmula propuesta por Nally *et al.* (2012). Se prepararon tres repeticiones por tratamiento y la evaluación se realizó tres veces.

$$\text{Incidencia \%} = \frac{\text{nd}}{\text{nT}} \times 100 \quad (1)$$

**Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la evaluación *in vitro* de la incidencia de pudrición gris en racimos de uva de mesa a 4 y 25 °C.**

**Table 1. Treatments used to evaluate *in vitro* incidence of gray mold on table grape clusters at 4 and 25 °C.**

| Tratamiento | Concentración                      |
|-------------|------------------------------------|
| T1(control) | Agua (1mL) + glicerol (2mL)        |
| T2          | EHA (2 mL) + 3 mL de glicerol      |
| T3          | DADS (20 µL)+ 30 µL de glicerol    |
| T4          | DATS (20 µL)+ 30 µL de glicerol    |
| T5          | Alicina (20 µL)+ 30 µL de glicerol |

incidence was quantified every other day during 14 days at 4 and 25 °C. Berries of each cluster with gray mold symptoms were counted. The results are presented as the disease incidence (percentage of infected berries) calculated using the formula proposed by Nally *et al.* (2012). Three replications per treatment were prepared and the evaluation was performed three times.

$$\text{Incidence \%} = \frac{\text{nd}}{\text{nT}} \times 100 \quad (1)$$

Where:

nd = number of berries with disease symptoms

nT = Total number of berries in the cluster

#### **Evaluation of the synergistic effect among DADS, DATS and allicin on gray mold caused by *Botrytis cinerea* on grape clusters**

To determine a possible synergistic effect among DADS, DATS and allicin compounds, a mixture containing 20 µL of each compound and 90 µL of glycerol was prepared. The mixture was homogenized with gentle agitation and kept in a cold-water bath until it was applied to the emitter. The treatments used are shown in Table 2. The same procedure described for independent compounds was used to determine the effect of the compound



Donde:

nd = Número de bayas con presencia de enfermedad

nT = Número total de bayas en el racimo

### Evaluación de efecto sinérgico entre DADS, DATS y alicina, en desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva

Para determinar un posible efecto sinérgico entre los compuestos DADS, DATS y alicina, se preparó una mezcla que contenía 20 µL de cada compuesto y 90 µL de glicerol. La mezcla se homogenizó con agitación suave y se mantuvo sobre baño frío hasta su aplicación sobre el emisor. Los tratamientos aplicados se muestran en el Cuadro 2. Para determinar el efecto de la mezcla de compuestos en la incidencia de la pudrición gris sobre los racimos de uvas, se utilizó el mismo procedimiento descrito para los compuestos independientes.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Para la evaluación de los compuestos independientes, se aplicó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y tres repeticiones y para la evaluación de la mezcla de compuestos, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 3 tratamientos y tres repeticiones. En ambos experimentos, la unidad experimental fue un racimo de 10 bayas, y la variable respuesta fue el número de bayas con presencia de pudrición gris, utilizando

mixture on the incidence of gray mold on grape clusters.

### Experiment design and statistical analysis

Independent compounds were arranged in a completely randomized design with 5 treatments and 3 replications; the mixture of compounds was arranged in a completely randomized design with 3 replications and 3 treatments. The experiment unit in both treatments was a 10-berry cluster, and the response variable the number of berries with gray mold symptoms. The percentage of disease incidence was calculated using the equation of Nally *et al.*, 2012. Data of the percentage of gray mold incidence were converted to  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$  and then subjected to an analysis of variance with a factor and, in case of significance, a media comparison was made using Tukey-Kramer test ( $P \leq 0.05$ ) and NCSS statistical program (Number Cruncher Statistical System, 2007).

## RESULTS

### Effect of EHA, DADS, DATS and allicin on gray mold development caused by *Botrytis cinerea* on grape clusters

The effect of volatiles emitted by the hydroalcoholic extract of garlic and DADS, DATS

**Cuadro 2. Tratamientos utilizados para la evaluación de la sinergia de DADS, DATS y alicina en la incidencia de pudrición gris en racimos de uva de mesa a 4 y 25 °C.**  
**Table 2. Treatments used to evaluate the synergy among DADS, DATS and allicin in the incidence of gray mold on table grape clusters at 4 and 25 °C.**

| Tratamiento | Concentración                                                     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------|
| T1(control) | Agua (1mL) + glicerol (2mL)                                       |
| T2          | EHA (2 mL) + 3 mL de glicerol                                     |
| T3          | DADS (20 µL) + DATS (20 µL) + Alicina (20 µL) + 90 µL de glicerol |

la ecuación de Nally *et al.*, 2012, para determinar el porcentaje de incidencia de la enfermedad. Los datos de porcentajes de incidencia de la pudrición gris se transformaron a  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ . Los datos fueron procesados en un análisis de varianza con un factor y en caso de significancia se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey-Kramer ( $P \leq 0.05$ ) con el programa estadístico NCSS (Number Cruncher Statistical System, 2007).

## RESULTADOS

### Efecto de EHA, DADS, DATS y Alicina en el desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva

El efecto de los volátiles emitidos por el extracto hidroalcohólico de ajo y DADS, DATS y alicina sobre el desarrollo de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluado durante 14 días después de la aplicación de los tratamientos, se muestra en la Figura 1, donde se observa que los volátiles emitidos por el T2 (EHA), mantuvieron un control sobre el desarrollo de la pudrición gris en las uvas, tanto a 4 °C como a 25 °C. Los tratamientos T3, T4 y T5 evaluados a 25 °C (Figura 1B), solamente el T4, presentó efecto similar ( $p \leq 0.05$ ) al EHA sobre el desarrollo de la pudrición gris. Los racimos bajo el tratamiento T3, presentaron un 70% de la incidencia de la pudrición gris y con el T5, la incidencia de la enfermedad se presentó igual ( $p \leq 0.05$ ) que el control, alcanzando el 100% al día 10 de los 14 que se mantuvo la evaluación.

El efecto de los tratamientos evaluados a 4 °C mostró que T2, T3 y T4, presentaron un control sobre el desarrollo de la pudrición gris (Figura 1A), y aunque T5 permitió un 10% de la incidencia de la enfermedad, el análisis estadístico resultó igual

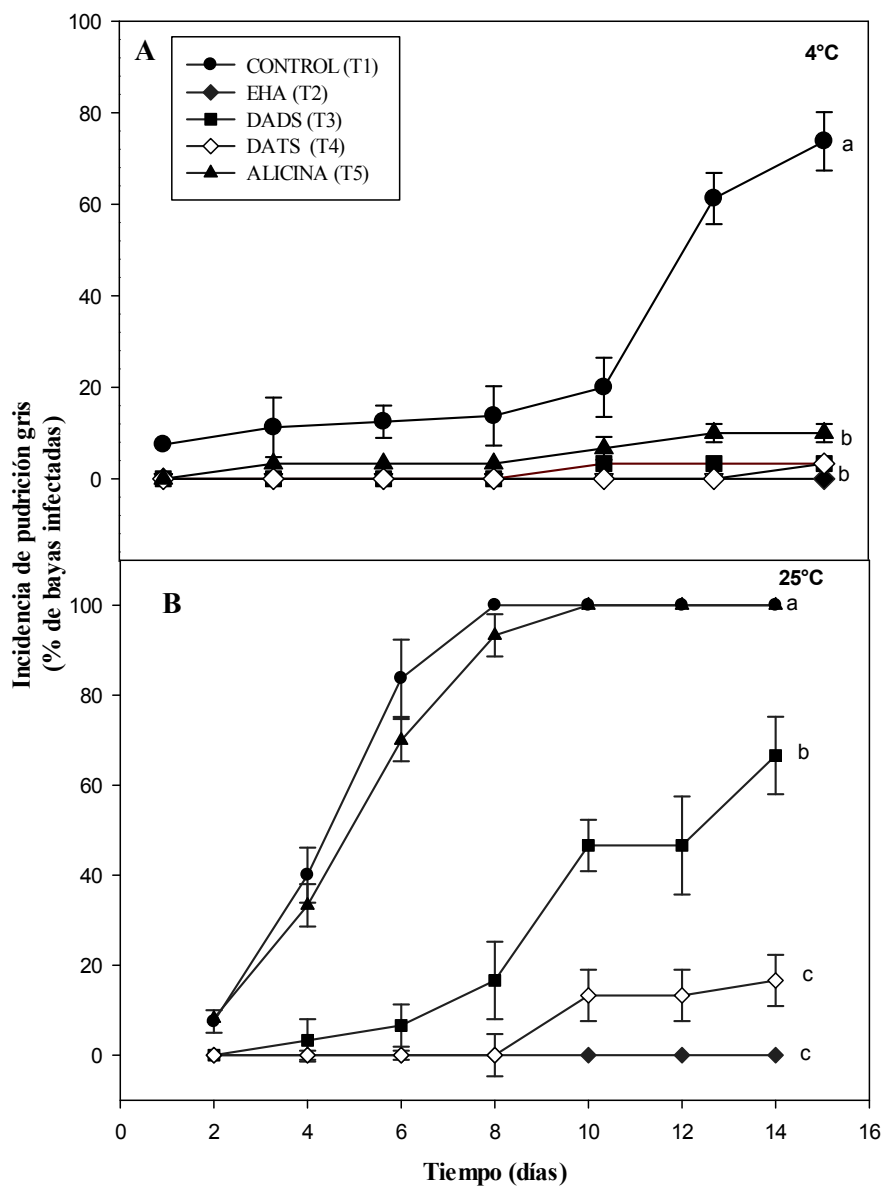
and allicin on gray mold development on table grape clusters evaluated during 14 days after treatment application is shown in Figure 1. The figure shows that volatiles emitted by T2 (EHA) controlled gray mold development on grape table clusters both at 4 °C and 25 °C. From T3, T4 and T5 treatments evaluated at 25 °C (Figure 1B), only T4 showed a similar effect ( $p \leq 0.05$ ) to EHA on gray mold development. Clusters treated with T3 showed 70% of gray mold incidence, and T5 a similar incidence ( $p \leq 0.05$ ) to that of the control, reaching 100% on day 10 of the 14-day evaluation.

The effect of the treatments evaluated at 4 °C showed that T2, T3 and T4 controlled gray mold development (Figure 1A), and although T5 allowed 10% of disease incidence, the statistical analysis ( $p \leq 0.05$ ) was the same as that of T2, T4 and T5. Special importance should be given to the effect of the treatments evaluated at 4 °C, because during the first 8 days under treatment, T5 showed only 5% of gray mold incidence, whereas the control presented 30%.

Effectiveness of the treatments evaluated to inhibit gray mold development on table grape clusters is shown in Table 3. Results show that T2 was more effective in controlling the disease during 14 days at 25 and 4 °C, followed by T4 treatment that controlled the disease 8 and 12 more days than the control at 25 and 4 °C, respectively.

### Synergistic effect of a mixture of DADS, DATS and allicin on gray mold development caused by *Botrytis cinerea* on table grape clusters

The mixture of DADS, DATS and allicin had a similar effect ( $P \leq 0.05$ ) that of EHA on gray mold development on grape clusters (Figure 2). When evaluated at 4 °C, both EHA and the mixture of compounds inhibited disease development during 14 days (Figure 2 A), while when evaluated



**Figura 1.** Efecto de los volátiles emitidos por EHA, DADS, DATS y alicina sobre el progreso de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluados a 25 y 4 °C, durante 14 días. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 bayas cada una. Barras verticales representan la desviación estandar (n=3). Letras iguales no son estadísticamente diferentes entre si de acuerdo con Tukey-Kramer para  $P \leq 0.05$ . El experimento se repitió tres veces.

**Figure 1.** Effect of volatiles emitted by EHA, DADS, DATS and alicin during gray mold development on table grape clusters evaluated at 25 and 4 °C during 14 days. Values represent the media of three replications of 10 berries each. Vertical bars represent the standard deviation (n=3). Values with the same letter are not statistically different from each other for  $P \leq 0.05$ , according to Tukey-Kramer. The experiment was conducted three times.

( $p \leq 0.05$ ) que T2, T4 y T5. Particularmente es destacado el efecto de los tratamientos evaluados a 4 °C, donde los primeros 8 días solamente en el tratamiento T5 se presentó el 5% de la incidencia de la pudrición gris, cuando el control ya presentaba un 30% de la enfermedad.

La eficacia de los tratamientos evaluados para inhibir el desarrollo de la pudrición gris en los racimos de uva de mesa se muestra en el Cuadro 3. Donde se observa que el T2 mostró el mejor control de la enfermedad durante 14 días en ambas temperaturas evaluadas. Seguido por el tratamiento T4 que mantuvo el control de la enfermedad por 8 y 12 días más que el control a 25 y 4 °C, respectivamente.

#### Efecto sinérgico de una mezcla de DADS, DATS y Alicina en el desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva

La mezcla de DADS, DATS y alicina presentó un efecto similar ( $P \leq 0.05$ ) al EHA en el desarrollo de la pudrición gris en racimos de uva (Figura 2). La evaluación a 4 °C, mostró que tanto el EHA como la mezcla de compuestos, inhibieron por 14

at 25 °C only EHA controlled the disease during 14 days. The mixture of DADS, DATS and allicin resulted in 9% of gray mold incidence at day 10; this value remained until day 14, when the evaluation ended.

## DISCUSSION

Given the growing interest to find natural alternatives to the use of  $SO_2$  to control gray mold on table grape (Parafati *et al.*, 2015), it was proposed to evaluate volatiles emitted by a garlic extract (EHA) and three of its main components (DADS, DATS and allicin) (Iciek *et al.*, 2009) to control the disease. Both EHA and DADS, DATS and allicin have showed to become bioactive at vapor phase (Curtis *et al.*, 2004; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015), a characteristic that makes it easier to use them in a gaseous form to control *B. cinerea*, a pathogen causing gray mold on grape clusters. Due to marketing norms, table grape berries should not come into contact with liquids after being harvested (Codex Stan 255, 2007). Several studies have been published on the

**Cuadro 3. Efectividad de los tratamientos sobre la protección de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluado *in vitro*.**

**Table 3. Evaluation *in vitro* of the effectiveness of treatments to protect clusters of table grape from gray mold.**

| Tratamiento           | Inicio de la enfermedad (días) |           | Incremento en la protección de la enfermedad (días) |      |
|-----------------------|--------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------|------|
|                       | 25 °C                          | 4 °C      | 25 °C                                               | 4 °C |
| T1 (Control)          | 2                              | 2         | -                                                   | -    |
| T2 (EHA) <sup>z</sup> | Más de 14                      | Más de 14 | 14                                                  | 14   |
| T3 (DADS)             | 4                              | 10        | 2                                                   | 8    |
| T4 (DATS)             | 10                             | 14        | 8                                                   | 12   |
| T5 (Alicina)          | 2                              | 4         | 0                                                   | 2    |

<sup>z</sup>El inicio de la enfermedad en el EHA fue posterior a los 14 días /<sup>z</sup>Disease development in EHA started 14 days after.

días el desarrollo de la enfermedad (Figura 2 A), mientras que la evaluación a 25 °C, mostró que únicamente el EHA mantuvo control del desarrollo de la enfermedad durante los 14 días. La mezcla de

antibacterial and antifungal effect of garlic extracts evaluated in liquid media (Harris *et al.*, 2001; Durairaj *et al.*, 2010). However, few studies have been published on volatile evaluations of garlic

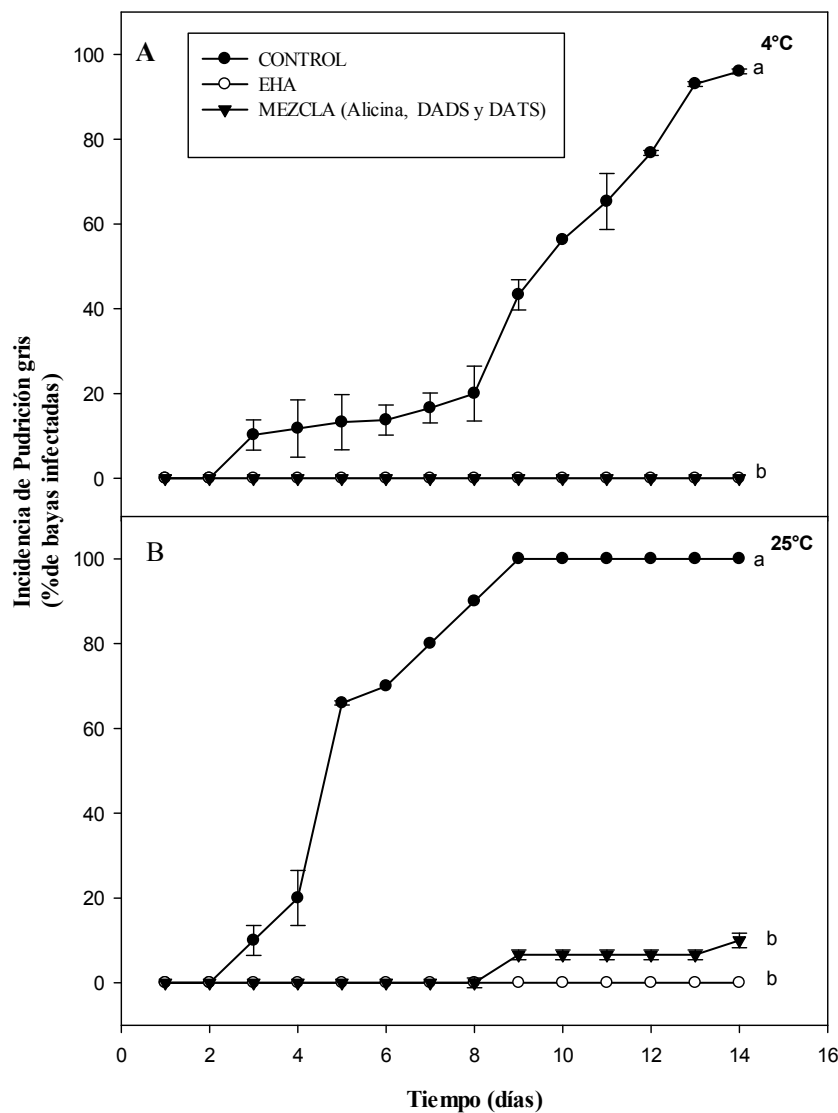


Figura 2. Efecto sinérgico de una mezcla de DADS, DATS y alicina sobre el progreso de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluados a 25 y 4 °C, durante 14 días, comparada con el EHA y su control. Barras verticales representan la desviación estandar (n=3). Letras iguales no son estadísticamente diferentes entre si de acuerdo con Tukey-Kramer para P≤0.05.

Figure 2. Synergistic effect of a mixture of DADS, DATS and alicin on gray mold development evaluated at 25 and 4 °C during 14 days, compared with EHA and its control. Vertical bars represent the standard deviation (n=3). Values with the same letter are not statistically different from each other for P≤0.05, according to Tukey-Kramer.

DADS, DATS y alicina, presentó 9% de incidencia de pudrición gris al día 10, permaneciendo ese valor hasta el día 14 que se mantuvo la evaluación.

## DISCUSIÓN

Debido al creciente interés por encontrar alternativas de ocurrencia natural al uso de  $\text{SO}_2$  para el control de la pudrición gris en uva de mesa (Parafati *et al.*, 2015), se planteó la evaluación de los volátiles que emite un extracto de ajo (EHA) y tres de sus principales componentes como DADS, DATS y alicina, (Iciek *et al.*, 2009) en el control de la pudrición gris en uva de mesa. Tanto el EHA como DADS, DATS y alicina, han demostrado ser bioactivos en la fase de vapor (Curtis *et al.*, 2004; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015;), facilitando la posibilidad de utilizarlos en forma gaseosa para el control de *B. cinerea*, causante de la pudrición gris en racimos de uva, donde este fruto, por normas regulatorias para su comercialización, no debe entrar en contacto con sustancias líquidas después de haber sido cosechada (Codex Stan 255, 2007). Varios trabajos se han publicado sobre el efecto antibacteriano y antifúngico de extractos de ajo evaluados en medios líquidos (Harris *et al.*, 2001; Durairaj *et al.*, 2010). Sin embargo, son pocos las publicaciones de evaluaciones en forma volátil de los compuestos del ajo. En trabajos publicado por Curtis *et al.* (2004) y Gándara-Ledezma *et al.* (2015), se demostró el potencial antimicrobiano de los derivados de ajo aplicados en forma volátil. En el presente estudio, esos resultados se extienden al control de la pudrición gris, al demostrar que los compuestos volátiles que emite el EHA, DADS y DTS presentaron una marcada reducción de la incidencia de esta enfermedad en racimos de uva de mesa (Cuadro 3, Figura 1). La efectividad del EHA y los compuestos azufrados en reducir la pudrición

compounds. Studies published by Curtis *et al.* (2004) and Gándara-Ledezma *et al.* (2015) showed the antimicrobial potential of garlic derivatives applied in a volatile manner. In this study, those results were extended to the control of gray mold by demonstrating that volatile compounds emitted by EHA, DADS and DTS resulted in a significant reduction in the incidence of gray mold on table grape clusters (Table 3, Figure 1). EHA and sulphur compounds were more effective in reducing gray mold at low temperatures (4 °C) (Figure 1A), a relevant fact for the purpose of this research since *B. cinerea* develops vigorously at low temperatures (-0.5 °C) (Lichter *et al.*, 2006) and spreads easily throughout grape clusters during transportation and cold storage (Crisosto *et al.*, 2012). The effect of allicin on the incidence of gray mold showed a contrasting result at both temperatures, showed a similar effect on the control ( $p \leq 0.05$ ) at 25 °C, as well as a similar effect on the more effective treatment (EHA) ( $P \leq 0.05$ ) at 4 °C. Results from allicin may be associated with thermal instability given that, when it is not in liquid media, at higher temperatures it volatilizes quickly (Chong *et al.*, 2015), which causes a loss of antifungal activity. This was demonstrated by Curtis *et al.* (2004), who evaluated the effect of allicin from a garlic extract applied in a volatile manner on bacteria and fungi; they observed that the antimicrobial activity of allicin decreased as temperature increased, while at 4 °C activity remained constant. Antifungal activity of garlic extracts has been correlated with allicin content (Singh *et al.*, 2001). However, in this research, DATS volatiles were better than allicin in controlling gray mold, since DATS delayed the onset of the disease by 12 days at 4 °C and 8 days at 25 °C (Table 3), and only EHA controlled the disease during 14 days at both temperatures (Table 3). EHA effectiveness is attributed to its content of sulphur compounds (allicin, DADS and DATS)

gris, fue mejor cuando se evaluó a bajas temperatura (4 °C) (Figura 1A), siendo de particular relevancia para el objetivo de este estudio, ya que *B. cinerea*, se desarrolla vigorosamente a bajas temperaturas (- 0.5 °C) (Lichter *et al.*, 2006), dispersándose con facilidad sobre la uva de mesa durante el transporte y almacenamiento en frío (Crisosto *et al.*, 2012). El efecto de la alicina sobre la incidencia de la pudrición gris, mostró un resultado opuesto en las dos temperaturas evaluadas, presentando un efecto similar al control ( $p \leq 0.05$ ) a 25 °C y un efecto similar al tratamiento más efectivo (EHA) ( $P \leq 0.05$ ) a 4 °C. Este comportamiento de la alicina puede estar relacionado a la inestabilidad térmica, donde a mayores temperaturas se volatiliza rápidamente al no estar en un medio líquido (Chong *et al.*, 2015), perdiendo su actividad antifúngica, lo cual fue demostrado por Curtis *et al.* (2004) quienes evaluaron el efecto de la alicina obtenida de un extracto de ajo aplicado de forma volátil sobre bacterias y hongos, observando que la actividad antimicrobiana de la alicina se perdía conforme se incrementaba la temperatura, mientras que a 4 °C la actividad se mantuvo constante. La actividad antifúngica de los extractos de ajo ha estado correlacionada con el contenido de alicina (Singh *et al.*, 2001). Sin embargo, en este trabajo los volátiles de DATS resultaron mejor que alicina en el control de la pudrición gris, donde DATS retrasó el inicio de la enfermedad en 12 días a 4 °C y 8 días a 25 °C (Cuadro 3), y solamente el EHA mantuvo el control de la enfermedad durante 14 días en ambas temperaturas evaluadas (Cuadro 3). La efectividad del EHA se ha atribuido a su contenido de compuestos azufrados (alicina, DADS y DATS) (Fujisawa *et al.*, 2008), los cuales pueden estar actuando de manera sinérgica, como fue posible comprobarlo en este estudio (Figura 2), al evaluar una mezcla de DADS, DATS y alicina, la cual mantuvo control del desarrollo de la pudrición gris en los racimos de

(Fujisawa *et al.*, 2008), which may be acting in a synergistic way, as it was demonstrated in this research (Figure 2) by evaluating a mixture of DADS, DATS and allicin that controlled gray mold development on grape clusters at 4 °C, while at 25 °C the disease decreased by 94% compared with its control. The mixture of DADS, DATS and allicin produced a better effect on disease incidence than the individual components evaluated under the same temperature conditions and concentration (Figures 1 and 2).

Although in the literature there are reports on active agents for controlling gray mold, such as those by Muñoz and Moret (2010) and Tripathi *et al.* (2008), who used chitosan and acibenzolar-S-methyl, essential oils, respectively, those compounds were evaluated in liquid media and in direct contact with the fungus. The strength of this research is based on the effectiveness of garlic derived-compounds to control gray mold when they are applied in a gaseous form. According to Martínez *et al.* (2007), when antifungal agents are applied in a gaseous form they are less effective than when applied in liquid form at the same doses. In spite of the good results to reduce the incidence of gray mold on table grape, sulphur compounds still require further evaluations to be proposed as fungicide agents, especially studies including different dose ranges in large-scale tests. Organoleptic tests should also be conducted to ensure the absence of touches of flavor in fruit conferred by sulphur compounds.

## CONCLUSIONS

Diallyltrisulfide and hydroalcoholic extract of garlic emitted volatiles that protected grape clusters against gray mold caused by *B. cinerea* during 14 days at 4 and 25 °C. This potential

uva evaluados a 4 °C, mientras que a 25 °C la reducción de la enfermedad fue del 94% comparada con su control. La mezcla de DADS, DATS y allicina, presentó mejor efecto sobre la incidencia de la enfermedad, que los componentes individuales evaluados a las mismas condiciones de temperatura y concentración (Figuras 1 y 2).

Aunque existen reportes en la literatura de agentes activos para el control de la pudrición gris como el de Muñoz y Moret (2010) y Tripathi *et al.* (2008), quienes utilizaron quitosano y metil acibenzolar, aceites esenciales, respectivamente, estos compuestos fueron evaluados en medios líquidos y en contacto directo con el hongo. La fortaleza de este estudio es la efectividad en el control de la pudrición gris mostrada por los compuestos derivados de ajo al ser aplicados en forma gaseosa, que de acuerdo con Martínez *et al.* (2007), los agentes antifúngico, cuando son aplicados en forma gaseosa, presentan menor efectividad que cuando la misma dosis es aplicada en forma líquida. Aun con los buenos resultados obtenidos en la reducción de la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa, los compuestos azufrados requieren de mayores evaluaciones para ser propuestos como agentes fungicidas, particularmente, estudios que incluyan diferentes rangos de dosis en pruebas de mayor escala. También son necesarias las evaluaciones organolépticas para asegurar la ausencia de notas de sabor conferidos por los compuestos azufrados a los frutos.

## CONCLUSIONES

El dialiltrisulfuro y un extracto hidroalcohólico de ajo emiten volátiles que son capaces de conferir protección a los racimos de uvas contra la pudrición gris causada por *B. cinerea* durante 14 días evaluados a 4 y 25 °C. Este potencial, abre la posibilidad de su utilización como una alternativa a los

offers the possibility to use them as an alternative to traditional fungicides to control postharvest diseases.

## Acknowledgments

The authors wish to thank to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the support scholarship granted to the first author of this study for her postgraduate studies at Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

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

fungicidas tradicionales para el control de enfermedades poscosecha.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada al primer autor para realizar los estudios de posgrado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

LITERATURA CITADA

- Chong K, Zamora MP, Tilakawardane DA, Buckely NE, Rego JA and Liu Y. 2015. Investigation of allicin stability in aqueous garlic extract by high performance liquid chromatography method. *Journal of Scientific Research and Reports* 4:590-598. <http://doi.org/10.9734/JSRR/2015/14301>
- CODEX STAN 255. Norma para las uvas de mesa. 2007. Disponible en línea: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/zh/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCODEX%2B252FSTAN%2B255-2007%252FCXS_255s.pdf
- Crisosto CH, Mitcham EJ and Kader A. 2012. Recomendaciones para mantener la calidad poscosecha. Davis, CA. Disponible en línea: http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Fruit_Spanish/?uid=56&ds=802

- Curtis H, Noll U, Störmann J and Slusarenko AJ. 2004. Broad-spectrum activity of volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and oomycetes. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 65:79-89. <http://doi.org/10.1016/j.pmp.2004.11.006>
- Durairaj S, Srinivasan S and Lakshmanaperumalsamy P. 2010. In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. *Electronic Journal of Biology* 6:92-97. Disponible en línea: <https://pdfs.semanticscholar.org/7042/5fe4ac5bfbf4ac9a51c4869496331ce1dbc9.pdf>
- Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Kumagal H, Seki T and Ariga T. 2008. Biological and Chemical Stability of Garlic-Derived Allicin. *Agricultural and Food Chemistry* 56:4229-4235. <http://doi.org/10.1021/jf8000907>
- Gándara-Ledezma A, Corrales-Maldonado C, Rivera M, Martínez-Téllez MA and Vargas-Arispuro I. 2015. Post-harvest control of gray mold in table grapes using volatile sulfur compounds from *Allium sativum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:487-503. <http://doi.org/10.1002/jsfa.6757>
- Harris JC, Cottrell SL, Plummer S and Lloyd D. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57:282-286. <http://doi.org/10.1007/s002530100722>
- Iciek, M, Kwiecien I and Wlodek L. 2009. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 50:247-265. <http://doi.org/10.1002/em.20474>
- Jansen H, Müller B and Knobloch K. 1987. Allicin Characterization and its Determination by HPLC. *Planta medica* 559-562. <http://doi.org/10.1055/s-2006-962811>
- Lichter A, Gabler FM and Smilanick JL. 2006. Control of spoilage in table grapes. *Stewart Postharvest Review*. 2:1-10. <http://doi.org/10.2212/spr.2006.6.1>
- Lichter A, Zutahy Y, Kaplunov T and Lurie S. 2008. Evaluation of table grape storage in boxes with sulfur dioxide-releasing pads with either an internal plastic liner or external wrap. *HortTechnology* 18:206-214. Disponible en línea: <http://horttech.ashspublishings.org/content/18/2/206.full>
- Martínez JA, Navarro A, Fernández JA and Bañón S. 2007. Using proclobutazol to delay the growth of *Botrytis cinerea* isolated from *Chamelaucium uncinatum*. *Australian Plant Pathology* 36:39-45. <http://doi.org/10.1071/AP06078>
- Milkota F, Smilanick JL, Mansour MF and Karaca H. 2010. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 55:85-90. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.09.004>
- Moo-Koh FA, Alejo CJ, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM, Sandoval-Luna R y Ramírez-Pool JA. 2014. Actividad in vitro del extracto acuoso de *Bonellia Flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia* 48:833-845. Disponible en línea: <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2014/nov-dic/art-6.pdf>
- Muñoz Z and Moret A. 2010. Sensitivity of *Botrytis cinerea* to chitosan and acibenzolar-S-methyl. *Pest Management Science* 66:974-979. <http://doi.org/10.1002/ps.1969>
- Nally MC, Pesce VM, Maturano YP, Muñoz CJ, Combina M, Toro ME, Castellanos de Figueroa LI and Vázquez F. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology* 64:40-48. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.009>
- NCSS Number Cruncher Statistical Systems, "Statistical Program for Windows", Kaysville, Utah, 2007.
- Parafati L, Vitale A, Restuccia C and Cirvilleri G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47:85-92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>
- Perelló A, Ulrike N and Slusarenko A. 2013. In vitro efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *Journal of Medicinal Plants Research* 7:1809-1817. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.511>
- Ruiz-Moreno MJ, Raposo R, Cayuela JM, Zafrilla P, Piñero Z, Moreno-Rojas JM, Molero J, Puertas B, Giron F, Guerrero RF and Cantos-Villar E. 2015. Valorization of Grape Stems. *Industrial and Crops Products* 63:152-157. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.016>
- Sanzani MS, Schena L, DeCicco V and Ippolito A. 2012. Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grape. *Postharvest Biology and Technology* 68:64-71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.02.003>
- Singh UP, Prithiviraj B, Sarma BK, Singh M and Ray BA. 2001. Role of garlic (*Allium sativum*) in human and Plant diseases. *Indian Journal of Experimental Biology* 39:310-322. Disponible en línea: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/23711/1/IJEB%2039%284%29%20310-322.pdf>
- Tripathi P, Dubey NK and Shukla AK. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Technology* 24:39-46. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9435-2>
- Tsao SM and Yin MC. 2001. In vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oil. *Journal of Medical Microbiology* 50:646-649. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-646>
- Tzortzakis N, Singleton I and Barnes J. 2007. Deployment of low-level ozone-enrichment for the preservation of chilled fresh produce. *Postharvest Biology and Technology* 43:261-270. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.09.005>
- Vázquez N, 2011. Asociación agrícola de productores de uva de mesa, modelo de agricultura moderna en México en el siglo XXI. Fundación Produce Sonora, A.C. México. 92p. Disponible en línea: <https://www.redinnovagro.in/casosexito/48sonorauvademesa.pdf>
- Wallock-Richards D, Doherty CJ, Doherty L, Clarke DJ, Place M, Place M, Govan RJ and Campopiano JD. 2014. Garlic Revisited: Antimicrobial Activity of Allicin-Containing Garlic Extracts against *Burkholderia cepacia* Complex. *PLoS ONE* 9:1-13. e112726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112726>
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P and Van Kan JA. 2007. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>

Techniques for isolation, identification and molecular characterization of Moko disease-related *Ralstonia solanacearum* strains

Técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de *Ralstonia solanacearum* relacionadas a Moko del plátano

José Abraham Obrador-Sánchez, Miguel Tzec-Simá, Blondy Canto-Canché*, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 X 32 y 34, Colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México; Inocencio Higuera-Ciajara, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México. *Autor para correspondencia: cantocanche@cicy.mx.

Recibido: 05 de Mayo, 2017.

Aceptado: 24 de Julio, 2017.

Obrador-Sánchez JA, Tzec-Simá M, Canto-Canché B, Higuera-Ciajara I. 2017. Techniques for isolation, identification and molecular characterization of Moko disease-related *Ralstonia solanacearum* strains. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 509-533.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1705-1

Primera publicación DOI: 01 de Septiembre, 2017.

First DOI publication: September 01, 2017.

Resumen. *Ralstonia solanacearum* es uno de los fitopatógenos más destructivos en la agricultura; en el cultivo de plátano la raza 2 causa la enfermedad denominada Moko del plátano, la cual en México está restringida a algunas áreas y provoca pérdidas cuando ocurren brotes epidémicos. La raza 2 comprende subgrupos (secuevares), los cuales usualmente son identificados mediante PCR de tipo Multiplex. El aislamiento de *R. solanacearum* es usualmente difícil, aún sobre medios semiselectivos, debido a su crecimiento lento y a la frecuente

Abstract. *Ralstonia solanacearum* is one of the most destructive phytopathogens in the agriculture. In banana cultivation, the race 2 causes Moko disease, which is present in some areas in Mexico, and when epidemic outbreaks burst there are losses. Race 2 comprises subgroups (sequevars) which are usually identified by Multiplex PCR reactions. Isolation of *R. solanacearum* is usually hard, even on semiselective media, because it grows slowly and it is frequently contaminated with *Pseudomonas*, *Klebsiella* and *Erwinia* bacteria, which show similar phenotypes. This work shows a strategy that make easy the isolation, identification and classification of *R. solanacearum* race 2. The protocol comprises immunodiagnosis of plant suspicious samples, confirmation of diagnosis by PCR, isolation on semiselective media SMSA and B-King, and genotyping of sequevars by single, specific PCR reactions. In the present work 25 strains were isolated from Tabasco, and they genotyped in sequevar 6. Their previous genotyping by Multiplex yielded confuse results,

contaminación con bacterias *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Erwinia*, que presentan fenotipos similares. En este trabajo se presenta una estrategia que facilita el aislamiento, identificación y clasificación de *R. solanacearum* raza 2. El protocolo comprende inmunodiagnóstico del material vegetal sospechoso, confirmación mediante PCR, aislamiento sobre medios semiselectivos SMSA y B-King, y genotipificación de los secuevares mediante reacciones de PCR sencillas, específicas. En el presente trabajo se aislaron 25 cepas de muestras obtenidas del estado de Tabasco, las cuales genotipificaron en el secuevar 6. Su previa genotipificación mediante Multiplex fue confusa, lo que evidencia que ese ensayo puede llevar a conclusiones erróneas. Por lo tanto no es válido proponer divergencia genética y emergencia de nuevas cepas con base en su resultado, como se ha hecho en algunos reportes recientes.

Palabras claves. Plátano, diagnóstico, aislamiento bacteriano, genotipificación, secuevar.

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) es uno de los fitopatógenos bacterianos más destructivos en la agricultura. Existe una alta variabilidad dentro de la especie, por lo que *R. solanacearum* es considerada una “especie complejo”, abreviado como RSSC por sus siglas en inglés “*Ralstonia solanacearum* species complex” (Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). Una especie complejo es definida como un grupo de aislados relacionados cercanamente, cuyos miembros individuales pueden representar más de una especie (Fegan y Prior, 2005). *R. solanacearum* tiene una amplia distribución mundial y un alto número de plantas hospedantes, que incluye cientos de plantas de al menos 54 familias botánicas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Prior *et al.*, 2016). Muchas de las especies vegetales afectadas son cultivos agrícolas estratégicos

which make evident that Multiplex can result in incorrect conclusions. We discourage to propose genetic divergence and emergency of new strains based on Multiplex results, as done in some recent reports.

Key words: Banana, diagnosis, bacterial isolation, genotyping, sequevar.

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) is one of the most destructive bacterial plant pathogens in agriculture. There is a high variability within the species, therefore *R. solanacearum* is considered a “species complex”, abbreviated as RSSC, for “*Ralstonia solanacearum* species complex” (Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). A species complex is defined as a group of closely-related isolations, the individual members of which can represent more than one species (Fegan and Prior, 2005). *R. solanacearum* has a wide global distribution and a high number of host plants, which include hundreds of plants from at least 54 botanical families, both dicotyledonous and monocotyledonous (Prior *et al.*, 2016). Many of the plant species affected are strategic crops or important subsistence foods. They include potatoes (*Solanum tuberosum*), tomato (*S. lycopersicum*), eggplant (*S. melongena*), peanut (*Arachis hypogea*) and banana (*Musa* spp.) (Cardozo *et al.*, 2010).

Bananas are the most widely produced tropical fruit in the world. In 2013, a worldwide production of approximately 17 million tons was reported (FAO, 2014). India is the main producer, with 26% of the global production. Bananas are a basic staple food and its export is an important source of income and jobs in several developing countries.

Mexico is one of the world’s 15 largest banana producers (FAO, 2017; Workman, 2017), with a production volume of 2.2 million tons and a

o importantes alimentos de subsistencia. Entre estos figuran la papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*), berenjena (*S. melongena*), maní (*Arachis hypogea*) y los plátanos (*Musa spp.*) (Cardozo *et al.*, 2010).

El plátano es la fruta tropical de mayor producción a nivel mundial. En el 2013 se reportó una producción de alrededor de 17 millones de toneladas (FAO, 2014). India es el principal productor, con el 26% del total mundial. El plátano es un producto básico para la alimentación y su exportación genera divisas y es fuente de empleo en numerosos países en desarrollo.

México está entre los primeros quince países en la producción de plátano (FAO, 2017; Workman, 2017), con un volumen de producción de 2.2 millones de toneladas y una derrama económica de M\$ 6,209,716.85 (SIAP, 2017). Se cultiva en 17 estados de México, siendo Chiapas y Tabasco los principales estados productores, contribuyendo con el 60% de la producción (SIAP, 2017).

El Moko bacteriano es uno de los problemas fitosanitarios más importantes en la agroindustria platanera en países tropicales, siendo la principal enfermedad bacteriana en este cultivo. En la actualidad la enfermedad se encuentra presente en varios países productores de plátano en América, Asia, África y Oceanía (Cardozo *et al.*, 2010).

El patógeno sobrevive o permanece latente en residuos de cosecha infectados y rizósfera de malezas hospedantes, siendo este el inóculo primario e infecta a plantas sanas por las raíces y heridas, colonizando los vasos del xilema. Los síntomas incluyen hojas amarillas y flácidas que finalmente colapsan y quedan adheridas a la planta; los frutos son chiclosos, de aspecto oscuro y tendiendo a degradarse. Se observa una necrosis vascular interna y la presencia de puntos oscuros debido a una infección sistémica. Esta enfermedad es común en el genotipo ABB (plátano de cocción), pero todos los

revenue of MXN\$ 6,209,716.85 (SIAP, 2017). It is planted in 17 states of Mexico, with Chiapas and Tabasco as the states with the highest production rate, contributing with 60% of the country's production (SIAP, 2017).

The bacterial Moko is one of the most important plant health problems in the banana agroindustry in tropical countries, since it is the main bacterial disease in this crop. Currently, the disease is present in several banana-producing countries in the Americas, Asia, Africa, and Oceania (Cardozo *et al.*, 2010).

The pathogen survives or remains latent in infected harvest residues and the rhizosphere of host weeds, the latter being the main inoculant, and infecting healthy plants through the roots and lesions, colonizing the xylem vessels. Symptoms include yellow, flaccid leaves that finally collapse and adhere to the plant; fruits have a gummy texture, with a dark appearance, and tending to degrade. An internal vascular necrosis is present, along with dark dots due to a systematic infection. This disease is common in the genotype ABB (cooking banana), but all types of bananas are affected (Albuquerque *et al.*, 2014). In Mexico, this disease appears in some areas and is subjected to official control; the campaign against banana Moko operates in the states of Chiapas, Tabasco, and Nayarit in order to reduce the spreading of the disease into areas without it (SENASICA, 2016).

Reports on *R. solanacearum*, the cause of Moko, claim it was introduced into Mexico in 1960 in the banana-producing area of Tapachula, Chiapas. Eight years later, the disease spread into another 12 municipal areas of the same state. In 1991, the first reports were presented in Teapa, Tabasco, and in 2009, the disease spread to the areas of Cunduacán, Huimanguillo, Centro, Cárdenas, and Jalapa. The banana Moko is present in the banana-producing municipal areas of Pichucalco, Huehuetán,

genotipos de plátanos son afectados (Albuquerque *et al.*, 2014). En México esta enfermedad se presenta en algunas áreas y está sujeta a control oficial; la campaña contra Moko del plátano opera en los estados de Chiapas, Tabasco y Nayarit, con el objetivo de reducir el riesgo de dispersión a zonas sin presencia (SENASICA, 2016).

Se tienen reportes que *R. solanacearum* causante de Moko se introdujo a México en 1960 en la zona platanera de Tapachula, Chiapas. Ocho años más tarde la enfermedad se extendió a otros 12 municipios de dicho estado. En 1991 se presentaron los primeros reportes en Teapa, Tabasco, y en el 2009 la enfermedad se extendió a los municipios de Cuauacán, Huimanguillo, Centro, Cárdenas y Jalapa. El Moko del plátano se encuentra presente en las zonas plataneras de Pichucalco, Huehuetán, Mazatán, Suchiate y Tapachula en el estado de Chiapas; en los municipios de Centro, Cuauacán, Huimanguillo, Jalapa, Teapa y Cárdenas en el estado de Tabasco, y en el municipio de Santiago Ixcuintla en el estado de Nayarit. Su incidencia ha aumentado en el estado de Tabasco en los últimos años (SENASICA, 2015). Actualmente está sujeta a control oficial, mediante la campaña fitosanitaria contra Moko del plátano, que opera en los estados de Chiapas, Tabasco y Nayarit, con el objetivo de reducir el riesgo de dispersión a zonas sin presencia, reduciendo los niveles de infestación en las zonas bajo control fitosanitario (SENASICA 2017).

R. solanacearum se subdivide en cinco biovars, con base en su metabolismo de carbohidratos, y cinco razas, en base al rango de hospedantes que infecta (Denny y Hayward, 2001; Fegan y Prior, 2005; Champoiseau *et al.*, 2009). Las razas pueden ser hospedante-específico como las 4 y 5 que infectan jengibre y mora respectivamente, o pueden presentar un amplio rango como la raza 1 (tomate, papa, berenjena, entre otros), la raza 3 (papa, tomate y geranio) y la raza 2 (heliconias y

Mazatán, Suchiate, and Tapachula in the state of Chiapas; in the municipal areas of Centro, Cuauacán, Huimanguillo, Jalapa, Teapa, and Cárdenas in the state of Tabasco, and in Santiago Ixcuintla in the state of Nayarit. Its incidence has increased in the state of Tabasco in recent years (SENASICA, 2015). It is currently under official control, with the plant health campaign against the Moko disease of banana, which is operant in the states of Chiapas, Tabasco, and Nayarit, with the aim of reducing the risk of spreading to areas with no incidence, reducing infestation levels in the areas under phytosanitary control (SENASICA 2017).

R. solanacearum is subdivided into five biovars, based on its carbohydrate metabolism, and five races, based on the range of hosts it infects (Denny and Hayward, 2001; Fegan and Prior, 2005; Champoiseau *et al.*, 2009). Races can be host-specific, such as races 4 and 5, which infect ginger and blackberry, respectively, or they can present a wide range, such as race 1 (tomato, potato, eggplant, and others), race 3 (potato, tomato, and geranium), and race 2 (heliconia and bananas) (Denny and Hayward, 2001; Champoiseau *et al.*, 2009).

Since *R. solanacearum* makes up a heterogenous group of strains with a high genetic and phenotypic diversity, its classification has been under constant reconsideration for 50 years (Hayward, 1964; Fegan and Prior, 2005; Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). Classification into biovars does not reflect the genetic background of the strains, so a genetic classification scheme is currently used, hierarchically organized into the categories of phylotypes and sequevars (Fegan and Prior, 2005; Prior *et al.*, 2016). Phylotypes correlate the strains of *R. solanacearum* with its geographic origins: phylotype I comprises mostly Asian strains; phylotype II, strains from the Americas; phylotype III, from Africa and the Indian Ocean; and

plátanos) (Denny y Hayward, 2001; Champoiseau *et al.*, 2009).

Debido a que *R. solanacearum* comprende un grupo heterogéneo de cepas con alta diversidad genética y fenotípica, su clasificación ha estado en continuos replanteamientos desde hace 50 años (Hayward, 1964; Fegan y Prior, 2005; Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). La clasificación en bio-vares no refleja el fondo genético de las cepas, por lo que actualmente se utiliza un esquema de clasificación genética organizada jerárquicamente en las categorías de filotipos y secuevares (Fegan y Prior, 2005; Prior *et al.*, 2016). Los filotipos correlacionan las cepas de *R. solanacearum* con sus orígenes geográficos: el filotipo I comprende cepas principalmente de Asia; el Filotipo II los de América; el Filotipo III de África y el Océano Índico; y el filotipo IV de Indonesia, Japón y Australia (Fegan y Prior, 2005). Los filotipos se subdividen en secuevares, los cuales están basados en la secuencia nucleotídica del gen *Egl*, que codifica para una endoglucanasa (Fegan y Prior, 2005). Hasta el momento, se han identificado 54 secuevares en el complejo de *R. solanacearum* (Li *et al.*, 2016); los secuevares causantes de la enfermedad Moko en plátano son el 3, 4, 6, 24, 25, 41 y 53. En el continente americano la enfermedad Moko está presente desde Brasil hasta Estado Unidos (Sanchez-Perez *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014).

Para estudios genéticos, de patogénesis u otras caracterizaciones, *R. solanacearum* es usualmente aislada en medio semiselectivo SMSA (“selective media from south africa”), (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010; Elphinstone *et al.*, 1996). Sin embargo, aún sobre este medio el aislamiento de esta bacteria es difícil debido al crecimiento de otros microorganismos (Champoiseau *et*

al. 2009). Phylotypes are subdivided into sequevars, which are based on the nucleotidic sequence of the gene *Egl*, which codifies for an endoglucanase (Fegan and Prior, 2005). So far, 54 sequevars have been identified in the complex *R. solanacearum* (Li *et al.*, 2016); the sequevars that cause the Moko disease in bananas are 3, 4, 6, 24, 25, 41, and 53. In the Americas, the Moko disease is present from Brazil to the United States (Sanchez-Perez *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014).

For genetic studies, pathogenesis, or other characterizations, *R. solanacearum* is usually isolated in the semiselective media SMSA (“selective media from South Africa”), (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010; Elphinstone *et al.*, 1996). However, even in this medium, isolating this bacteria is difficult, due to the growth of other microorganisms (Champoiseau *et al.*, 2009; Kalpage y De Costa, 2015), particularly bacteria of the genera *Klebsiella*, *Erwinia*, and *Pseudomonas*. These three gram-negative bacteria, like other species of *Ralstonia*, such as *Ralstonia mannitolilytica*, are majority endophytic in banana plants (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). These bacteria are common contaminants in *R. solanacearum* plantations, since they present a faster growth and similar microscopic and colonial morphologies (French *et al.*, 1995; Nasim, 2011).

The isolation of pure *R. solanacearum* strains can take a long time (French *et al.*, 1995; Thera, 2007; Dööltokeidieva and Bobuşeva, 2014; Dööltokeidieva and Bobuşeva, 2016). This report describes a strategy that makes the isolation and genetic characterization of *R. solanacearum* easier, from banana diseased with Moko.

al., 2009; Kalpage y De Costa, 2015), particularmente bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Erwinia* y *Pseudomonas*. Estos tres géneros de bacterias gram-negativas, así como otras especies de *Ralstonia* como por ejemplo *Ralstonia mannitolilytica*, son endófitos mayoritarios en las plantas de plátano (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). Estas bacterias son contaminantes comunes en los cultivos de *R. solanacearum* debido a que presentan mayor capacidad de crecimiento y muestran morfologías microscópicas y coloniales similares (French *et al.*, 1995; Nasim, 2011).

El aislamiento de cepas puras de *R. solanacearum* puede llevar bastante tiempo (French *et al.*, 1995; Thera, 2007; Döölökeldieva y Bobuşeva, 2014; Döölökeldieva y Bobuşeva, 2016). En este reporte se describe una estrategia que facilita el aislamiento y caracterización genética de *R. solanacearum* a partir de plátano enfermo de Moko.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de tejidos vegetales

Se realizaron muestreos en Tabasco (20-24 de octubre, 2014) con apoyo del personal del Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco (CESVETAB) para la ubicación, diagnóstico visual y colecta del material, de acuerdo a instrucciones del SENASICA. Las muestras se depositaron en bolsas tipo Ziploc y se etiquetaron con la información del tejido colectado, fecha y sitio de muestreo. Las muestras fueron colocadas en hieleras con geles refrigerantes y enviadas al laboratorio de biotecnología molecular de plátano del Centro de Investigación Científica de Yucatán, donde fueron procesadas.

MATERIALS AND METHODS

Sampling plant tissues

Samples were taken in Tabasco (October 20-24, 2014) with the technical support of the personnel from the Tabasco Local Plant Health Committee (Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco - CESVETAB) for the location, visual diagnosis and collection of material, according to instructions by SENASICA. The samples were deposited in Ziploc bags and labelled with the information of the tissue collected, date and sampling site. The samples were placed in coolers with cooling gels and sent to the banana molecular biotechnology lab in the Scientific Research Center (Centro de Investigación Científica) in Yucatan, where they were processed.

Detection of *R. solanacearum* by immunology tests

To detect *R. Solanacearum*, the ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (Agdia®, N.C. SRP 33900) was carried out in a 96-well tray, following the instructions of the manufacturer. Positive controls and samples of plants infected with *R. solanacearum* produce a blue color, whereas negative controls and samples of healthy plants produce a colorless result. The tray was visually examined to avoid false positives by possible contaminations or impurities on the tray and the spectrophotometric absorbance was measured at 655 nm (Bio-Rad Modelo 680XR). Optic densities equal to or lower than 0.09 was considered negative. To scrutinize the samples in the lab, ImmunoStrips (Agdia®, N.C. STX33900)

Detección de *R. solanacearum* por pruebas inmunológicas

Para la detección de *R. solanacearum* se utilizó el ensayo ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (Agdia®, N.C. SRP 33900), en placa de 96 pozos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y muestras de plantas infectadas con *R. solanacearum* generan una coloración azul; los controles negativos y muestras de plantas sanas dan resultado incoloro. Se examinó visualmente la placa para evitar falsos positivos por posibles contaminaciones o suciedad en la placa y se midió la absorbancia espectrofotométrica a 655 nm (Bio-Rad Modelo 680XR). La densidad óptica igual o menor de 0.09 se consideró negativo. Para el escrutinio de las muestras en el laboratorio también se utilizaron inmuntiras (Agdia®, N.C. STX33900), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de ADN

Para enriquecer la población de *R. solanacearum* en el medio SMSA, un fragmento (1 cm²) del tejido vegetal infectado se depositó en el medio líquido y se incubó durante 24 h en agitación a 180 rpm a 28 °C (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). Una alícuota de este cultivo (1.5 mL) se centrifugó a 5,200 X g durante 5 min. La pastilla bacteriana se resuspendió con 1 mL de buffer CTAB (2% de bromuro de cetil trimetil-amonio, 1% polivinil pirrolidona, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA), agitando con vórtex durante 30s. Posteriormente se congeló a -20 °C por 10 min y se incubó a 65 °C a baño María por 20 min. Se temperizó 1 min a temperatura ambiente y centrifugó a 20,800 X g. El sobrenadante se recuperó en tubo de 1.5 mL para microcentrífuga, se adicionaron 500 µL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se agitó

were also used, following the instructions of the manufacturer.

DNA extraction

To enrich the *R. solanacearum* population in the SMSA medium, a fragment (1 cm²) of the infected plant tissue was deposited in the liquid medium and incubated for 24 h, shaking constantly at 180 rpm at 28 °C (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). One aliquot of this culture (1.5 mL) was centrifuged at 5,200 X g for 5 min. The bacterial pellet was resuspended with 1 mL of the buffer CTAB (2% cetyl trimethyl ammonium bromide, 1% polyvinylpyrrolidone, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA), stirring with a vortex for 30s. Later it was frozen at -20 °C for 10 min and incubated at 65 °C in a water bath for 20 min. It was tempered for 1 min at room temperature and centrifuged at 20,800 X g. The supernatant was recovered in a 1.5 mL tube for centrifuging, 500 µL of phenol:chlorophorm:isoamylic (25:24:1) were added, and stirred for 10 min at room temperature (CNRF, 2012). Later, it was centrifuged for 5 min at 20,800 X g and the aqueous phase was collected. Next, the standard DNA recovery procedure was carried out using cold absolute ethanol, washings with 70% ethanol, air-drying of the pellet and resuspension in ultrapure distilled water (Sambrook and Russell, 2001). The DNA purity was determined by spectrophotometry at 260nm/280nm and the integrity was determined by electrophoresis in agarose gel.

Detection of *R. solanacearum* by PCR

Detection was carried out by the amplification of genomic regions with the primers of 759: 5'-GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC - 3' and 760: 5'- GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA

por 10 min a temperatura ambiente (CNRF, 2012). Posteriormente, se centrifugó 5 min a 20,800 X g y se colectó la fase acuosa. Se continuó con el procedimiento estándar de recuperación de ADN con etanol absoluto frío, lavados con etanol al 70%, secado de la pastilla y resuspensión en agua destilada ultrapura (Sambrook y Russell, 2001). La pureza del ADN se determinó por espectrofotometría a 260nm/280nm y la integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Detección de *R. solanacearum* por PCR

La detección se realizó mediante la ampliación de regiones genómicas con los iniciadores de 759: 5'- GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC - 3' y 760: 5'- GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG- 3 (Diagnóstico universal de *R. solanacearum*, 280 pb), (Opina *et al.*, 1997); pehA#3-F 5'- CAG CAG AAC CCG CGC CTG ATC CAG- 3' y pehA#6-R 5'- ATC GGA CTT GAT GCG CAG GCC GTT- 3' (gen *pga*, 532pb), (Gillings *et al.*, 1993); ISRso19-F 5'- TGG GAG AGG ATG GCG GCT TT - 3' y ISRso19-R 5' - TGA CCC GCC TTT CGG TGT TT - 3' (iniciadores específicos a la Raza 2; 1884pb), (Lee y Chin, 2003). La mezcla de reacción de PCR se preparó con 20 ng de ADN, 0.1 µM de cada iniciador, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen®), IX del Buffer de la enzima Taq, , 200 µM de cada dNTP y 1.5 mM MgCl₂, en 25µL de volumen final. El programa en el termociclador (Bio-Rad modelo T100™) para el diagnóstico universal de *R. solanacearum* (iniciadores 759/760) tuvo un ciclo de desnaturalización de 2 min a 96 °C, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 s, alineamiento a 64 °C por 20 s y un ciclo de 72 °C por 1 min y al final, un ciclo de extensión de 72 °C por 5 min. El programa de amplificación para los otros genes fue idéntico, excepto que el paso de alineamiento fue de 70°C por 45 s para el

TCG- 3 (Universal diagnosis for *R. solanacearum*, 280 pb), (Opina *et al.*, 1997); pehA#3-F 5'-CAG CAG AAC CCG CGC CTG ATC CAG- 3' and pehA#6-R 5'- ATC GGA CTT GAT GCG CAG GCC GTT- 3' (gen *pga*, 532pb), (Gillings *et al.*, 1993); ISRso19-F 5'- TGG GAG AGG ATG GCG GCT TT - 3' and ISRso19-R 5' - TGA CCC GCC TTT CGG TGT TT - 3' (primers specific to Race 2; 1884pb), (Lee and Chin, 2003). The PCR reaction mixture was prepared with 20ng of DNA, 0.1 µM of each primer, 1 U of recombinant DNA Taq polymerase (Invitrogen®), IX of the Buffer of the Taq enzyme, 200 µM of each dNTP and 1.5 mM MgCl₂, in 25µL of final volume. The program in the thermocycler (Bio-Rad model T100™) for the universal diagnosis of *R. solanacearum* (primers 759/760) had a denaturalization cycle of 2 min at 96 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, alignment step at 64 °C for 20 s, and a step of 72 °C for 1 min, and finally, an extension cycle of 72 °C for 5 min. The amplification program for the other genes was identical, except for the step of alignment was 70 °C for 45 s for the gene *pga*, and for Race 2, alignment was 55°C for 30 s, and the extension of 72 °C for 1.5 min in each cycle. The products (10 µL of each PCR reaction) were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel (p/v) using the buffer TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X supplemented with 3 µL of ethidium bromide (10mg/mL). The strips were visualized over a transilluminator using UV light (Gel Doc™ XR, Bio-Rad).

Isolation of *R. solanacearum*

Tissues (pseudostem and fruit) which were positive at immunology tests ELISA and ImmunoStrips were used for bacterial isolation. Samples were cut into small pieces with a sterilized blade, and later disinfested by washing twice with sterilized water, sodium hypochlorite at 10% (from

gen *pga*, y para la raza 2 el alineamiento fue de 55 °C por 30 s y la extensión de 72 °C por 1.5 min en cada ciclo. Los productos (10 µL de cada reacción PCR) se analizaron por electroforesis, en gel de agarosa de 1.5% (p/v) usando buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X suplementado con 3 µL de bromuro de etidio (10mg/mL). La visualización de las bandas se realizó sobre un transiluminador con luz UV (Gel Doc™ XR, Bio-Rad).

Aislamiento de *R. solanacearum*

Se utilizaron tejidos (pseudotallo y fruto) que fueron positivos en los ensayos inmunológicos de ELISA e inmunitiras. Las muestras se cortaron en pequeños trozos con una cuchilla estéril y posteriormente se desinfectaron mediante dos lavados con agua estéril, hipoclorito de sodio al 10% (partiendo de una solución comercial al 6%) durante 1 min, agua estéril, etanol por 30 s, agua estéril y posteriormente se colocó en buffer TE y se dejó incubar por una hora, con agitación suave. Se sembró una asada sobre medio semiselectivo SMSA (formulación por cada litro: 1g de casaminoácidos, 10g de peptona, 5g de glucosa, 5mg de cristal violeta, 100mg de β-sulfato de polimyxina, 25mg de bacitracina, 5mg de cloranfenicol, 0.5mg de penicilina, 17g de agar bacteriológico, 50mg de TZC (2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio) y se incubó a 28 °C durante 72 h (Kelman, 1954; Cardozo *et al.*, 2010). Las colonias resultantes fueron sembradas por estría cruzada sobre medio B-King sólido y cultivadas a 28 °C por 48 h. El medio B-King permite distinguir a las bacterias *Pseudomonas* spp. debido a que éstas generan fluorescencia al ser expuestas a una longitud UV de 360 nm, mientras que *R. solanacearum* no fluoresce (King *et al.*, 1954; Dulla and Lindow, 2009; Lamichhane y Varvaro, 2013).

a commercial solution at 6%) for 1 min, sterile water, ethanol for 30 s, sterile water, and it was later placed in TE buffer and left to incubate for an hour, stirring softly. A bacterial loop was placed on a semi-selective SMSA medium (formula for every liter: 1g of casamino acids, 10g of peptone, 5g of glucose, 5mg crystal violet, 100mg polymyxin β-sulfate, 25mg bacitracine, 5mg chloranphenicol, 0.5mg penicillin, 17g bacteriological agar, 50mg TZC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) and incubated at 28 °C for 72 h (Kelman, 1954; Cardozo *et al.*, 2010). The bacterial colonies were streak by crossing on a solid B-King medium and incubated at 28 °C for 48 h. The B-King medium helps to distinguish *Pseudomonas* spp. bacteria, since they produce fluorescence when exposed to a UV wavelength of 360 nm, whereas *R. solanacearum* does not fluoresce (King *et al.*, 1954; Dulla and Lindow, 2009; Lamichhane and Varvaro, 2013).

Characterization of the sequevar

For the characterization of the sequevars, we used the primers of the Mus serie from Fegan and Prior (2005): 5'-CGGGTCGCTGAGACGAATATC-3' and 5'-GCCTTGTCAGAAATCCGAATG-3' (Sequevar 4, 351 pb); 5'-GCAGTAAAGAAACCCGGTGT-3' and 5'-TCTGGCGAAAGACGGGATGG-3' (Sequevar 3, 400pb); 5'-GCTGGCATTGCTCCCGCTCAC-3' and 5'-TCGCTTCCGCCAAGACGC-3' (Sequevar 4 SFR, 167 pb); 5'-CGTTCTCCTTGTCAGCGATGG-3' and 5'-CCCGTGTGACCCCGATAGC-3' (Sequevar 6, 221 pb). PCR was carried out in Multiplex using 20 ng of DNA, 2 U of recombinant DNA Taq polymerase (Invitrogen®), 1X of the Buffer of the Taq enzyme, 200 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂

Caracterización del secuevar

Para la caracterización de los secuevares se utilizaron los iniciadores de la serie Mus de Fegan y Prior (2005): 5'-CGGGTCGCTGAGACGA-ATATC-3' y 5'-GCCTTGTCAGAAATCCGA-ATG-3' (Secuevar 4, 351 pb); 5'-GCAG-TAAAGAAACCCGGTGT-3' y 5'-TCTGGC-GAAAGACGGGATGG-3' (Secuevar 3, 400 pb); 5'-GCTGGCATTGCTCCCGCTCAC-3' y 5'-TCGCTTCCGCCAAGACGC-3' (Secuevar 4 SFR, 167 pb); 5'-CGTTCTCCTTGTCAGCGATGG-3' y 5'-CCCGTGTGACCCCGATAGC-3' (Secuevar 6, 221 pb). Se realizó PCR en Multiplex utilizando 20 ng de ADN, 2 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen®), 1X del Buffer de la enzima Taq, 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂ y 6 pmoles de cada iniciador, en un volumen final de 25µL. Las condiciones de PCR fueron similares a las descritas previamente, usando temperatura de alineamiento de 59 °C. Las PCR sencillas para cada secuevar se realizaron en las mismas condiciones, pero usando en cada caso una sola pareja de iniciadores. En cada caso se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 15 µL del producto de la reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó el diagnóstico de Moko bacteriano en muestras de pseudotallo y fruto de plátano de plantas sospechosas. El diagnóstico del material vegetal colectado se realizó mediante 2 pruebas serológicas y 2 ensayos de PCR. Un total de 40 muestras fueron analizadas, de las cuales 35 fueron positivas en el diagnóstico con el ELISA y 28 con el diagnóstico con las inmuntiras. Las 40 muestras fueron analizadas por PCR con los dos pares de iniciadores, y ambas reacciones de PCR amplificaron 28

and 6 pmoles of each primer, in a final volume of 25µL. The PCR conditions were similar to those described previously, using an alignment temperature of 59 °C. Single PCRs for each secuevar were carried out in the same conditions, but using only one pair of primers in each case. In each case, 15 µL of the product of the reaction was analyzed by in gel electrophoresis.

RESULTS AND DISCUSSION

The diagnosis for bacterial Moko disease was carried out on suspicious banana plant pseudostems and fruits. The diagnosis of the plant material collected was carried out with 2 serological tests and 2 PCR tests. A total of 40 samples were analyzed, out of which 35 were positive in the diagnosis with ELISA and 28 with the diagnosis with ImmunoStrips. All 40 were analyzed with PCR with the two pairs of primers, and both PCR reactions amplified 28 samples. The diagnosis with the ImmunoStrips provided a congruence of 100% with the PCR diagnoses, both in the number of positives and in the samples identified, whereas the ELISA test presented 20% of error (7 false positives out of the 35). Neither of the two immunological methods presented false negatives (Table 1). Figures 1A and 1B show typical results obtained in the ELISA diagnoses and with ImmunoStrips. Some ImmunoStrips were darker than others, depending on the phenolization of the extract, yet the color did not interfere in the reaction of the control line and that of the negative or positive result.

The ELISA technique has been widely used in the protocols for the identification of *R. solanacearum* amongst colonies with similar phenotypes (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Dööltoeldieva and Bobusheva, 2016). The diagnosis is based on the use of monoclonal antibodies against

muestras. El diagnóstico con las inmunotiras proporcionó 100% de congruencia con los diagnósticos por PCR, tanto en número de positivas como en las muestras identificadas, mientras que el ensayo ELISA presentó un 20% de error (7 falsas positivas de las 35). Ninguno de los dos métodos inmunológicos presentó falsos negativos (Cuadro 1). Las Figuras 1A y 1B muestran resultados típicos obtenidos en los diagnósticos de ELISA y con las inmunotiras. Algunas inmunotiras eran más oscuras que otras, dependiendo de la fenolización del extracto, pero la coloración no interfirió en la reacción de la línea de control y la del resultado negativo o positivo.

La técnica de ELISA ha sido ampliamente usada en los protocolos de identificación de *R. solanacearum* entre colonias con fenotipo similares (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Dööltoekeldieva y Bobusheva, 2016). El diagnóstico se basa en el uso de anticuerpos monoclonales contra exopolisacáridos (EPS) producidos por la bacteria. Naranjo-Feliciano y Martínez-Zubiaur (2013) diagnosticaron tejidos vegetales enfermos comparando los ensayos de ELISA, la aglutinación con partículas látex y la detección de *R. solanacearum* por PCR. La aglutinación con partículas látex fue la técnica más rápida y más sencilla entre las 3, pero fue menos específica, ya que reaccionó con otros microorganismos, y un orden de magnitud menos sensible (límite 10^6 ufc/mL) que la otra prueba serológica.

exopolysaccharides (EPS) produced by the bacteria. Naranjo-Feliciano and Martínez-Zubiaur (2013) diagnosed diseased plant tissues by comparing the ELISA trials, agglutination with latex particles, and the detection of *R. solanacearum* by PCR. The agglutination with latex particles was the quickest and simplest technique of the 3, but it was less specific, since it reacted with other microorganisms, and it is less sensitive by one order of magnitude (límite 10^6 ufc/mL) than the other serological test. According to the manufacturer, the *R. solanacearum* detection limit in the ELISA technique is of 10^5 ufc/mL. These authors observed differences in reliability of the detection of the pathogenic bacteria by the 3 methods, when they compared the results of the diagnosis with the development of the plant's disease, afterwards. The reliability of the diagnosis using PCR was up to 20% higher than with the ELISA test. In this work, the PCR test confirmed 80% of the positive cases diagnosed using ELISA, indicating 20% of false positives in this serological tests, which coincides with the report by Naranjo-Feliciano and Martínez-Zubiaur (2013). Other authors have discussed the limitations of the ELISA test and the advantages of molecular markers, which can detect up to 10^2 ufc/mL (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). Eriksson and Aspan (2007) compared PCR and ELISA in the diagnosis of bacteria of the genus *Salmonella* in pig fecal samples, and they found discrepancies

Cuadro 1. Diagnóstico de la enfermedad Moko bacteriano en plantas de plátano con sintomatología sospechosa.
Table 1. Diagnosis of the bacterial Moko disease in banana plants with suspicious symptomatology.

| | Positivas | PCR
Iniciadores 759, 760
(universales para
<i>R. solanacearum</i>) | PCR
Iniciadores
pehA#3-F, pehA#6-R
(gen pga) | Falsos
positivos | Falsos
negativos | Certeza
(%) |
|--------------------------|-----------|--|---|---------------------|---------------------|----------------|
| ELISA ^x | 35 | 28 | 28 | 7 | 0 | 80 |
| INMUNOTIRAS ^x | 28 | 28 | 28 | 0 | 0 | 100 |

^xSe analizaron en total 40 muestras: 14 de pseudotallo y 26 de fruto / ^xA total of 40 samples were analyzed: 14 pseudostem and 26 fruit samples.

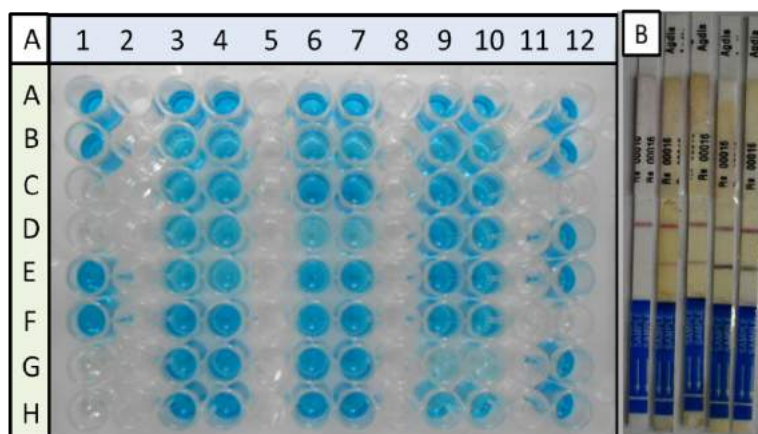


Figura 1. Diagnóstico serológico de Moko bacteriano en muestras de pseudotallo y fruto de plátano. Panel A, diagnóstico por ELISA. Los controles y muestras fueron analizados por duplicado. Columna 1, controles negativos (Filas C, D, G y H) y positivos (Filas A, B, E y F). Las muestras se colocaron en las columnas 3, 4, 6, 7, 9, 10 y 12. Panel B, diagnóstico mediante inmunotiras; se incluye el resultado de una muestra negativa (una sola línea que corresponde al control); muestras positivas, dos líneas. En ambos diagnósticos se observan diferencias en la intensidad de color de la señal en las muestras positiva, lo cual se relaciona con las diferencias en la cantidad de inóculo, de acuerdo al fabricante.

Figure 1. Serological diagnosis of bacterial Moko disease in banana pseudostem and fruit samples. Panel A, diagnosis by ELISA. Controls and samples were analyzed by duplicate. Column 1, negative (Rows C, D, G, and H) and positive controls (Rows A, B, E, and F). Samples were placed in columns 3, 4, 6, 7, 9, 10, and 12. Panel B, diagnosis by immunostrips; the result of a negative sample is included (only one line for the control); positive samples, two lines. Both diagnoses show differences in the intensity in color of the signal in the positive samples, which is related to the differences in the amount of inoculant, according to the manufacturer.

De acuerdo al fabricante, el límite de detección de *R. solanacearum* en la técnica de ELISA es de 10^5 ufc/mL. Estos autores observaron diferencias en la confiabilidad de la detección de la bacteria patógena por los 3 métodos, cuando compararon los resultados del diagnóstico con el desarrollo de la enfermedad en la planta posteriormente. La confiabilidad del diagnóstico por PCR fue hasta 20% superior en comparación con la prueba de ELISA. En el presente trabajo la prueba de PCR confirmó 80% de los casos positivos diagnosticados con ELISA, indicando 20% de falsos positivos en esta prueba serológica, lo que coincide con el reporte de Naranjo-Feliciano y Martínez-Zubiaur (2013). Otros autores han discutido las limitaciones de la prueba de ELISA y las ventajas sobre ella de los métodos moleculares, que pueden detectar hasta

between the results of both techniques due to the low specificity of the antibodies used, which shows that the problem of the immunodiagnosis by ELISA is not exclusive of the *R. Solanacearum* diagnosis.

The *R. solanacearum* diagnosis in the banana samples with ImmunoStrips was 100% congruent with the later detection by PCR. ImmunoStrips are a pocket diagnosis, also sold by Agdia®, Inc. and offers the same limit of detection than the ELISA test (10^5 ufc/mL). These ImmunoStrips have been used in other investigations as a method to confirm the identities of isolated *R. solanacearum* strains (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012). Thera (2007) used ImmunoStrips to diagnose *R. solanacearum* in tomato, potato, tobacco, and green chili pepper tissues. The ImmunoStrips had one false negative in a frozen sample of green

10^2 ufc/mL (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008). Eriksen y Aspan (2007) compararon la PCR y el ELISA en el diagnóstico de bacterias del género *Salmonella* en muestras fecales de cerdo, y encontraron discrepancia entre los resultados de ambas técnicas debido a la baja especificidad de los anticuerpos que usaron, lo que muestra que la problemática del inmunodiagnóstico por ELISA no es exclusivo del diagnóstico de *R. solanacearum*.

El diagnóstico de *R. solanacearum* en las muestras de plátano con las inmuntiras fue 100% congruente con la detección posterior por PCR. La inmuntira es un diagnóstico de bolsillo, comercializado también por Agdia®, Inc. y ofrece el mismo límite de detección que el ensayo de ELISA (10^5 ufc/mL). Estas inmuntiras han sido usadas en otros trabajos como método confirmativo de identidad de cepas aisladas de *R. solanacearum* (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012). Thera (2007) utilizó inmuntiras para diagnosticar *R. solanacearum* en tejidos de tomate, de papa, de tabaco y de chile verde. Las inmuntiras tuvieron un falso negativo en una muestra congelada de chile verde y confirmaron 24 de las 25 muestras infectadas (96%), lo que apoya que esta prueba tiene alta certidumbre.

Korus (2011) diagnosticó *Clavibacter michiganensis* comparando ELISA e inmuntiras y obtuvo resultados similares de 100% de eficiencia de detección usando inmuntiras, en comparación con eficiencias de detección variables (entre 33 y 100%) en las pruebas con ELISA para diferentes subespecies del patógeno. Ambos ensayos pueden usar los mismos anticuerpos, como es el caso de los productos Agdia® para detectar *R. solanacearum*. La detección con las inmuntiras es sencilla, *i.e.* la muestra es macerada y aplicada sobre la inmuntira, mientras los ensayos ELISA incluyen múltiples pasos como preparación de buffers, tiempos prolongados de incubación y múltiples lavados, lo cual incrementa la posibilidad de error. También puede

chilies and confirmed 24 of the 25 infected samples (96%), supporting the fact that this test has a high degree of certainty.

Korus (2011) diagnosed *Clavibacter michiganensis* comparing ELISA and ImmunoStrips and obtained similar results of an efficiency of 100% using ImmunoStrips, in comparison with variable detection efficiencies (33 to 100%) in ELISA tests for different pathogen subspecies. Both tests can use the same antibodies, as in the case of Agdia® products to detect *R. solanacearum*. Detection with ImmunoStrips is simple, *i.e.* the sample is macerated and applied on the ImmunoStrip, whereas ELISA tests include multiple steps such as buffer preparations, prolonged incubation times, and multiple washing steps, which increase the possibilities of error. A dilution effect could also occur in the sample in the ELISA test, affecting the detection in some samples (Ruiz-García *et al.*, 2009).

The robustness of the *R. solanacearum* diagnosis with ImmunoStrips in banana tissues in this and other investigations (Thera, 2007), as well as its speed, simplicity and portability, make its use advisable to monitor *R. solanacearum* on the field, and for the gathering of samples for the isolation and study of the bacteria. The confirmation of the diagnosis must continue to be with molecular markers, since the limits of serological detection do not allow for the detection of cases of early infection (Thera, 2007), nor do they distinguish between the different races of *R. solanacearum* (Rajeshwari *et al.*, 1998).

Isolation of *R. solanacearum*

With the sequential use of 2 culture media, SMSA and B-King, it was possible to isolate 25 *R. solanacearum* strains from the 28 positive samples. The three samples from which *R. solanacearum*

ocurrir un efecto de dilución de la muestra en el ensayo ELISA, afectando la detección en algunas muestras (Ruiz-García *et al.*, 2009).

La robustez del diagnóstico de *R. solanacearum* con las inmuntiras en los tejidos de plátano, en el presente trabajo y otros (Thera, 2007), así como su rapidez, sencillez y portabilidad, hacen que su uso sea aconsejable para monitorear *R. solanacearum* en campo, y para la colecta de muestras para el aislamiento y estudio de la bacteria. La confirmación del diagnóstico deberá continuar siendo con los métodos moleculares ya que los límites de detección serológicos no permiten detectar casos de infección temprana (Thera, 2007), y tampoco distinguen entre las diferentes razas de *R. solanacearum* (Rajeshwari *et al.*, 1998).

Aislamiento de *R. solanacearum*

Mediante el uso secuencial de 2 medios de cultivo, el SMSA y el B-King, se logró aislar 25 cepas de *R. solanacearum* de las 28 muestras positivas. Las tres muestras donde no se pudo recuperar *R. solanacearum* fueron las que presentaron las líneas diagnósticas más pálidas en las inmuntiras, lo que indica que esas muestras contenían una baja cantidad de bacteria.

El medio SMSA es frecuentemente utilizado para el aislamiento de *R. solanacearum*, porque evita el crecimiento de muchos otros microorganismos (Kelman, 1954; Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010). Sin embargo, aun así *R. solanacearum* es difícil de aislar debido a que *in vitro* presenta crecimiento lento, mientras otras bacterias, *e.g.* *Pseudomonas*, crecen rápido y contaminan los aislamientos (Ramesh *et al.*, 2009; Champoiseau *et al.*, 2009; Nasim, 2011; Kalpage y De Costa, 2015). La combinación del medio SMSA y el medio B-King permite distinguir *R. solanacearum* de *Pseudomonas* spp. Ambos tipos de bacterias crecen sobre el medio SMSA como

could not be recovered had the palest diagnosis lines in the ImmunoStrips, indicating that these samples contained a low bacteria count.

The SMSA medium is frequently used to isolate *R. solanacearum*, since it avoids the growth of many other microorganisms (Kelman, 1954; Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2010). However, even so, *R. solanacearum* is difficult to isolate since it has slow growth rates *in vitro*, while other bacteria, *e.g.* *Pseudomonas*, grow quickly and contaminate the isolations (Ramesh *et al.*, 2009; Champoiseau *et al.*, 2009; Nasim, 2011; Kalpage and De Costa, 2015). The combination of the media SMSA and B-King helps to distinguish *R. solanacearum* from *Pseudomonas* spp. Both of these bacteria grow on the SMSA medium as mucoid cultures, with irregular, white edges, and pink to red centers. On the B-King medium, *Pseudomonas* spp. fluoresces, whereas *R. solanacearum* do not (Figure 2), helping to put them apart. Ramesh *et al.*, (2009) point out that genus *Pseudomonas* is opportunist during the colonization of the host by *R. solanacearum*. Along with *Pseudomonas*, the bacteria *Klebsiella*, *Erwinia*, and other species of the genus *Ralstonia*, such as *Ralstonia mannitolilytica*, are mostly endophytic of the banana (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). The bacteria recovered from the 3 samples that produced faint lines on the ImmunoStrips presented fluorescence on the B-King medium and did not amplify in any of the PCR diagnosis reactions for *R. solanacearum*. Some of these bacteria were identified by sequencing the 16S, and belonged to *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas citronellolis*, consistent with reports by the bibliography.

Confirmation of the identity of *R. solanacearum*

The identity of the *R. solanacearum* strains was confirmed by sequencing the amplified fragment

colonias mucoides, de bordes blancos irregulares y centros rosas a rojos. Sobre el medio B-King las colonias de *Pseudomonas* spp. fluorescen mientras que las de *R. solanacearum* no lo hacen (Figura 2), lo que permite distinguirlas entre sí. Ramesh *et al.*, (2009) señalan que las bacterias del género *Pseudomonas* son oportunistas durante la colonización del hospedero por *R. solanacearum*. Además de las *Pseudomonas*, las bacterias *Klebsiella*, *Erwinia* y otras especies del género *Ralstonia*, como *Ralstonia mannitolilytica*, son endófitas mayoritarias del plátano (Thomas *et al.*, 2008; Ganen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). Las bacterias recuperadas de las 3 muestras que dieron las líneas tenues en las inmuntiras presentaron fluorescencia sobre el medio B-King y no amplificaron en ninguna de las reacciones de PCR de diagnóstico para *R. solanacearum*. Algunas de esas bacterias fueron identificadas mediante secuenciación del 16S, y correspondieron a *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas citronellolis*, consistente con lo reportado en la bibliografía.

with primers pehA#3-F, pehA#6-R (fragment of the gene *pga*). The 25 strains that amplified the 532pb diagnostic band were confirmed to be *R. solanacearum* using the BlastN analysis with the sequences obtained, and compared with the GenBank database (hit 99-100% identity with *R. solanacearum*). Based on the positive PCR results when using the primers ISRso19, the 25 isolated strains corresponded to Race 2.

The identification of the sequevars was first determined by PCR Multiplex, using the primers of the series Mus (Fegan and Prior, 2005). According to these authors, each sample must give only one diagnostic DNA band: ~167 pb (sequevar 4 ecotype SFR), ~350 pb (sequevar 4), ~220 pb (sequevar 6), ~400 pb (sequevar 3). These DNA bands were observed among the products of the Multiplex (Figure 3A), although they were not unique DNA bands per sample. According to the Multiplex (Figure 3A), the Race 2 *R. solanacearum* strains genotype in sequevar 3 (lanes 11 and 13), sequevar 4 (lanes 3 and 5), sequevar 4 SFR (lane

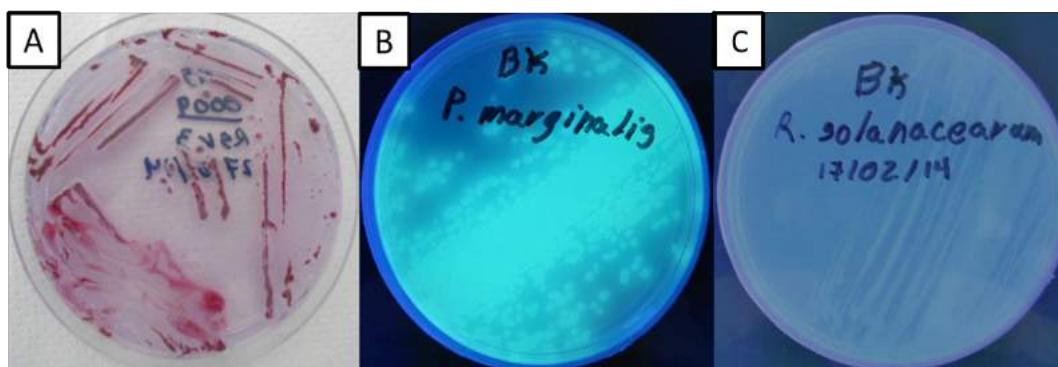


Figura 2. Pre-selección de bacterias con fenotipo similar a *R. solanacearum*. Aislamiento sobre medio SMSA (panel A). Las colonias con características mucoides, bordes blancos irregulares y centros rojos fueron transferidas sobre medio B-King. Las bacterias del género *Pseudomonas* fluorescen sobre este medio (Panel B). Se seleccionaron las bacterias no fluorescentes (panel C) para continuar el aislamiento de *R. solanacearum*.

Figure 2. Preselection of bacteria with similar phenotypes to *R. solanacearum*. Isolation on SMSA medium (panel A). Strains with mucoid characteristics, white, irregular edges and red centers were transferred on a B-King medium. Bacteria of the genus *Pseudomonas* fluoresce on this medium (Panel B). Non-fluorescent bacteria were selected (panel C) to continue the isolation of *R. solanacearum*.

Confirmación de la identidad *R. solanacearum*

La identidad de las cepas *R. solanacearum* fue confirmada mediante secuenciación del fragmento amplificado con los iniciadores *pehA#3-F*, *pehA#6-R* (fragmento del gen *pga*). Las 25 cepas que amplificaron la banda diagnóstica de 532pb fueron confirmadas como *R. solanacearum* mediante el análisis BlastN con las secuencias obtenidas, y comparando con la base de datos de GenBank (hit 99-100% de identidad con *R. solanacearum*). Con base en los resultados positivos de la PCR cuando se usaron los iniciadores *ISRso19*, las 25 cepas aisladas corresponden a la Raza 2.

La identificación de los secuevares se determinó primero mediante PCR Multiplex, usando los iniciadores de la serie Mus (Fegan y Prior, 2005). De acuerdo a estos autores, cada muestra debe de dar una sola banda diagnóstica: de ~167 pb (secuevar 4 ecotipo SFR), ~350 pb (secuevar 4), ~220 pb (secuevar 6), ~400 pb (secuevar 3). Estas bandas se visualizaron en los productos de la Multiplex (Figura 3A), pero no fueron bandas únicas por muestra. De acuerdo a la Multiplex (Figura 3A), las cepas de *R. solanacearum* Raza 2 genotifican en el secuevar 3 (carriles 11 y 13), secuevar 4 (carriles 3 y 5), secuevar 4 SFR (carril 1) y secuevar 6 (carriles 2, 4, 6, 8). Otras cepas generaron perfiles que no pudieron asignarse a ninguno de los secuevares (e.g. carriles 7, 10). Debido a la inconsistencia en los resultados de la PCR en Multiplex, cada cepa fue posteriormente genotificada mediante PCR independiente para cada secuevar. Ninguna cepa de Tabasco amplificó con las parejas de iniciadores para los secuevares 3, 4 y 4 SFR (datos nos mostrados). Las 25 cepas amplificaron la banda diagnóstica de ~220 pb con la pareja de iniciadores *SI28*, que corresponde al secuevar 6 (Figura 3B). El secuevar 6 se originó en las islas del Caribe (Trinidad) y llegó al continente en Venezuela; en 1950 se introdujo

1), and sequevar 6 (lanes 2, 4, 6, 8). Other strains produced profiles that could not be assigned to any of the sequevars (e.g. lanes 7, 10). Due to the inconsistency in results of the PCR in Multiplex, each strain was later genotyped using independent PCR for each sequevar. No Tabasco strains amplified with the pairs of primers for sequevars 3, 4 and 4 SFR (data not shown). The 25 strains amplified the diagnostic DNA band of ~220 with the pair of primers *SI28*, that corresponds to sequevar 6 (Figure 3B). Sequevar 6 originated in the Caribbean islands (Trinidad) and entered the continent mainland through Venezuela; in 1950, it was accidentally introduced into Costa Rica in infected banana corms. In 1960, a commercial freight ship introduced it accidentally into Honduras, and from there it spread rapidly northward to Mexico and southward to Panama (Sequeira, 1998). The first report in Mexico was in 1960 in Chiapas. Currently, sequevar 6 has been reported in North America in Hawaii (Fegan and Prior, 2005) and Florida (Hong *et al.*, 2012); in Central America, in Guatemala (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008), and in South America, in Brazil (Albuquerque *et al.*, 2014). Central and South America are considered the center of origin of strains related to the Moko disease of banana (Sequerira, 1998; Fegan and Prior, 2005, 2006). Other countries in the Americas have, along with sequevar 6, some of the sequevars 3, 4, 24, 25, 41, and 53 (Raymundo *et al.*, 1998; Prior and Fegan, 2005; Albuquerque *et al.*, 2014). Studies in Mexico must be broadened to determine if there are other sequevars related to the bacterium causing Moko disease in banana.

The taxonomic classification of the strains of the *R. solanacearum* species complex (RSSC) has been under constant revision and correction for over 50 years, and more frequently in the last 10 years (Peeters *et al.*, 2013; Prior *et al.*, 2016). As the world collections increase, and along

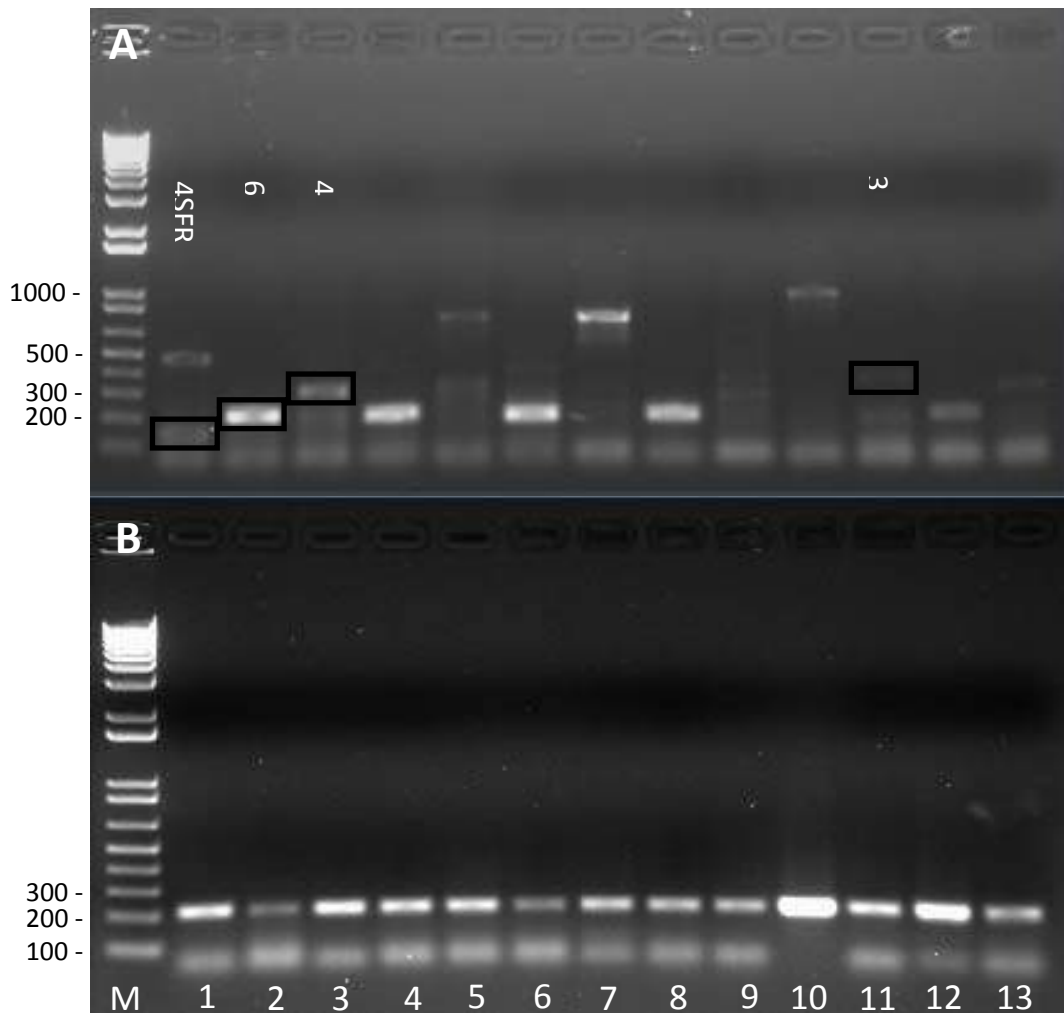


Figura 3. Caracterización de bacterias *R. solanacearum* aisladas a partir de plantas de plátano; tipificación de los secuevarres. Panel A, PCR en Multiplex (Iniciadores de la serie Mus y SI28 juntos). El carril 1 presentó una banda de ~167 pb que corresponde a lo esperado para el secuevar 4 SFR y otra de ~450 pb no descrita para ningún secuevar; el carril 2 muestra una banda de aproximadamente ~220 pb que corresponde a lo descrito para el secuevar 6; en el carril 3 se observó una banda de ~350 pb, lo que corresponde al secuevar 4. En los carriles siguientes se observaron bandas inesperadas, como por ejemplo ~850 pb (carriles 5 y 7) y ~1000pb (carril 10). Panel B, PCR con iniciadores específicos para el secuevar 6 (iniciadores SI28, banda diagnóstica de ~220 pb). En ambos paneles los carriles corresponden a: M) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA); carriles 1-13, cepas de *R. solanacearum*, 1) MT01, 2) MT02, 3) MT03, 4) MT04, 5) MT05, 6) MT06, 7) MT07, 8) MT08, 9) MT09, 10) MT10, 11) MT11, 12) MT12, 13) MT13.

Figure 3. Characterization of *R. solanacearum* bacteria isolated from banana plants; tipification of the sequevars. Panel A, PCR in Multiplex (primers of the series Mus and SI28 together). Lane 1 shows a band of ~167 pb that corresponds to expected for sequevar 4 SFR, and another of ~450 pb, not described for any sequevar; lane 2 shows a band of approximately ~220 pb that corresponds to descriptions for sequevar 6; lane 3 showed a band of ~350 pb, which corresponds to sequevar 4. The following lanes showed unexpected bands, such as ~850 pb (lanes 5 and 7) and ~1000pb (lane 10). Panel B, PCR with specific primers for sequevar 6 (primers SI28, diagnosis band of ~220 pb). In both panels the lanes correspond to: M) Marker 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA); lanes 1-13, strains of *R. solanacearum*, 1) MT01, 2) MT02, 3) MT03, 4) MT04, 5) MT05, 6) MT06, 7) MT07, 8) MT08, 9) MT09, 10) MT10, 11) MT11, 12) MT12, 13) MT13.

accidentalmente a Costa Rica en cormos de plátano infectados. En 1960 un embarque comercial lo introdujo accidentalmente en Honduras y de allí se dispersó rápidamente por el norte a México y por el sur a Panamá (Sequeira, 1998). En México el primer reporte fue en 1960 en Chiapas. Actualmente el secuevar 6 se ha reportado en Norte América en Hawai (Fegan y Prior, 2005) y Florida (Hong *et al.*, 2012); en Centroamérica en Guatemala (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008) y en Sudamérica en Brasil (Albuquerque *et al.*, 2014). El Centro y Sudamérica es considerado el centro de origen de las cepas relacionadas a Moko del plátano (Sequerira, 1998; Fegan y Prior, 2005, 2006). Otros países en América tienen, además del secuevar 6, alguno(s) de los secuevares 3, 4, 24, 25, 41 y 53 (Raymundo *et al.*, 1998; Prior y Fegan, 2005; Albuquerque *et al.*, 2014). El estudio en México debe ampliarse para determinar si existen otros secuevares relacionadas al Moko bacteriano del plátano.

La clasificación taxonómica de las cepas del complejo de especies de *R. solanacearum* (RSSC) ha estado en constante revisión y corrección desde hace 50 años y más frecuentemente en los últimos 10 (Peeters *et al.*, 2013; Prior *et al.*, 2016). A medida que las colecciones mundiales van aumentando y junto con ella la diversidad genética global conocida del RSSC, se han encontrado discrepancias en los resultados de clasificación de algunas cepas mediante diferentes herramientas de diagnóstico (Hong *et al.*, 2012), e incluso en clasificación de poblaciones, como son los casos de las *R. solanacearum* aisladas de Solanáceas y Cucurbitáceas en la Guayana Francesa y de tomate en Guadalupe (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Deberdt *et al.*, 2014). Aunque las razones de las inconsistencias no son del todo claras, algunas de las diferencias se han convertido en herramientas de diagnóstico. Por ejemplo, muchas cepas del secuevar 4 producen la banda de 351 pb con los iniciadores Mus06, pero

with them, the known global genetic diversity of the RSSC, discrepancies have been found in the classification results of some strains with different diagnosis tools (Hong *et al.*, 2012), and even in the classification of populations, such as in the cases of the isolated *R. solanacearum* of Solanaceae and Cucurbits in the French Guyana, and tomatoes in Guadalupe (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Deberdt *et al.*, 2014). Although the reasons for the inconsistencies are not entirely clear, some of the differences have turned into diagnosis tools. For example, many strains of secuevar 4 produce a 351 pb band with primers Mus06, but they additionally amplify a band of 167pb (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), while some strains of secuevar 4 isolated in Florida in 2008 do not produce the diagnosis band of 351pb, but only the unspecific 167pb band, therefore the authors propose that the Florida strains that only amplify the 167pb band are emerging strains (Hong *et al.*, 2012).

The Multiplex to distinguish between secuevares 3, 4, and 6 within Race 2 (*i.e.* strains causing banana Moko) was generated by Fegan and Prior (2005) and it has been used to classify strains in Martinique (Wicker *et al.*, 2007, 2009), Colombia (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), United States (Hong *et al.*, 2012), French Guyana (Deberdt *et al.*, 2014), Brazil (Albuquerque *et al.*, 2014), and others. In the reports that show electrophoresic analyses of the PCR products, we can notice unspecific bands in some lanes, alongside the diagnosis band (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014), as observed in this investigation about Mexico. Even the analysis of one same secuevar shows discrepancies between the different research groups. Secuevar 4 amplifies 2 bands in the Moko Multiplex, although the band sizes are different between the report by Álvarez-Restrepo *et al.*, (2008) and the one by Albuquerque *et al.*, (2014), despite both investigations having

adicionalmente amplifican una banda de 167pb (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), mientras que algunas cepas del secuevar 4 aisladas en Florida en 2008 no producen la banda diagnóstica de 351pb sino únicamente la banda inespecífica de 167pb, con lo que los autores proponen que las cepas de Florida que amplifican únicamente la banda de 167pb son cepas emergentes (Hong *et al.*, 2012).

El Multiplex para identificar entre los secuevares 3, 4 y 6 dentro de la Raza 2 (*i.e.* cepas causantes de Moko en plátano) fue generado por Fegan y Prior (2005) y ha sido usado para clasificar cepas en Martinica (Wicker *et al.*, 2007, 2009), Colombia (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008), Estados Unidos (Hong *et al.*, 2012), La Guayana francesa (Deberdt *et al.*, 2014), Brasil (Albuquerque *et al.*, 2014), entre otros. En los reportes que muestran los análisis electroforéticos de los productos de PCR se pueden observar en algunos carriles bandas inespecíficas adicionales a la banda diagnóstica (Álvarez-Restrepo *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014), como lo observado en el presente trabajo de México. Incluso el análisis de un mismo secuevar muestra discrepancias entre los diferentes grupos de investigación. El secuevar 4 amplifica 2 bandas en el Multiplex de Moko, pero los tamaños de las bandas son diferentes entre el reporte de Álvarez-Restrepo *et al.*, (2008) y el de Albuquerque *et al.*, (2014); a pesar de que en ambos trabajos se utilizaron geles de agarosa de la misma concentración (1.5% p/v).

En el presente trabajo el diagnóstico por Multiplex fue ambiguo. En el caso de las cepas que amplificaron la banda de 221pb (secuevar 6), esta fue una banda única (Figura 3A, carriles 2, 4, 6, 8, 12), contrario al resultado de Albuquerque *et al.*, (2014) que obtuvieron 2 bandas para la cepa IBSBF2661 (secuevar 6), pero similar a lo obtenido por Hong *et al.*, (2012), quienes también obtuvieron una sola banda para la cepa 527 (secuevar 6) en la Multiplex

used agarose gels with the same concentrations (1.5% p/v).

In this investigation the diagnosis by Multiplex was ambiguous. In the case of the strains that amplified the 221pb band (secuevar 6), it was a single band (Figure 3A, lanes 2, 4, 6, 8, 12), contrary to results by Albuquerque *et al.*, (2014) who obtained 2 bands for the strain IBSBF2661 (secuevar 6), but similar to results obtained by Hong *et al.*, (2012), who also obtained one band for strain 527 (secuevar 6) in the Moko Multiplex. In some Mexican strains, the diagnostic band expected for secuevars 3 (400pb, lane 11) and 4 (351pb, 167pb, lanes 1 and 3) were amplified, although other bands observed in those same lanes do not coincide with any of the reports. PCR bands were also observed that have not been reported previously in the Multiplex results for Moko strains (Figure 3A, lanes 5, 7, 10), or in other words, they are new bands. The new ~850 pb band amplifies in different strains (Figure 3A, lanes 5 and 7), suggesting they have a genetic origin, and it reflects the diversity in the populations of *R. solanacearum*. These results are difficult to interpret in further detail because the diagnosis primers amplify marker bands, although the function in the microorganism of those genomic regions is unknown (Deberdt *et al.*, 2014).

The presence of new and reproducible PCR products in different strains (*e.g.* ~850 pb band in strains MT05 and MT07) could be interpreted as an emergence of new strains of *R. solanacearum* in Tabasco, as proposed for the Florida strains that presented atypical results in this Multiplex diagnosis (Hong *et al.*, 2012). Due to the ambiguity of results, the individual diagnosis of each secuevar was carried out. No amplification of any strain was obtained in the diagnosis of secuevars 3 or 4 (data not shown). All the strains isolated in Tabasco in this investigation belong to secuevar 6 (Figure 3B). The recommendation by the present report is

de Moko. Con algunas cepas mexicanas se observó amplificación de la banda de diagnóstico esperada para los secuevars 3 (400pb, carril 11) y 4 (351pb, 167pb, carriles 1 y 3), pero otras bandas observadas también en esos mismos carriles no coinciden con ninguno de los trabajos reportados. También se observaron bandas de PCR que no se han reportado previamente en los resultados de Multiplex de cepas de Moko (Figura 3A, carriles 5, 7, 10) es decir, son bandas nuevas. La banda nueva de ~850 pb amplifica en diferentes cepas (Figura 3A, carriles 5 y 7), lo que sugiere que tienen una base de origen genético y refleja la diversidad en las poblaciones de *R. solanacearum*. Es difícil interpretar con más detalle estos resultados porque los iniciadores de diagnóstico amplifican bandas marcadoras, pero la función en el microorganismo de esas regiones genómicas es desconocida (Deberdt *et al.*, 2014).

La presencia de productos de PCR nuevos y reproducibles en diferentes cepas (*e.g.* banda de ~850 pb en cepas MT05 y MT07), pudiera interpretarse como emergencia de nuevas cepas de *R. solanacearum* en Tabasco, como fue propuesto para las cepas de Florida que presentaron resultados atípicos en este diagnóstico Multiplex (Hong *et al.*, 2012). Debido a la ambigüedad de resultados se realizó el diagnóstico individual de cada secuevar. No se obtuvo amplificación de ninguna cepa en los diagnósticos de los secuevars 3 y 4 (datos no mostrados). Todas las cepas aisladas en Tabasco en el presente trabajo pertenecen al secuevar 6 (Figura 3B). La recomendación que surge en el presente reporte es no basarse en resultados de Multiplex de Moko para proponer emergencia de nuevas cepas de *R. solanacearum*. Se sugiere que los productos amplificados sean secuenciados.

La Figura 4B presenta un resumen del protocolo propuesto a partir del presente trabajo, con el objetivo de simplificar el aislamiento de cepas de *R. solanacearum* Raza 2. Se compara con el procedimiento

to avoid basing only in Moko Multiplex results to propose the emergence of new *R. Solanacearum* strains. We suggest amplified products to be sequenced.

Figure 4B presents a summary of the protocol proposed from the present investigation, in order to simplify the isolation of *R. solanacearum* Race 2 strains. It is compared with the procedure followed by other investigations (Figure 4A). Procedure 4A is more expensive, since the diagnosis by ELISA or ImmunoStrips must be carried out on each isolated bacterial strain. In the present research, that strategy had little success. When the samples were not diagnosed before isolation, a large part of the bacteria isolated on the SMSA were not *R. solanacearum*. The sequential use of B-King medium after the isolation on SMSA is a quick and inexpensive option that allows the phenotypic preselection of *R. solanacearum*. According to the bibliography, the most reliable *R. solanacearum* identity diagnoses are PCR and sequencing, whether of ITS or specific genes (Fegan and Prior, 2005). After confirming the identity of *R. solanacearum*, the collection of isolated bacteria can be characterized genetically, phenotypically, phylogenetically, or be used for other studies. We recommend performing individual PCR with the specific primers of each Moko secuevar instead of the Moko Multiplex whenever results are unclear.

Moko is a quarantine-regulated disease in Mexico and a phytosanitary campaign is established. Identified outbreaks are therefore under continuous surveillance and eradication measures. It is important to emphasize that due to regulations and for food security, it is crucial to prevent the dispersal of the pathogen by collection of the material by inexperienced personnel. For this reason, all studies of this pathogen in Mexico should be carried out with the permission of, and in collaboration with the General Plant Health Board

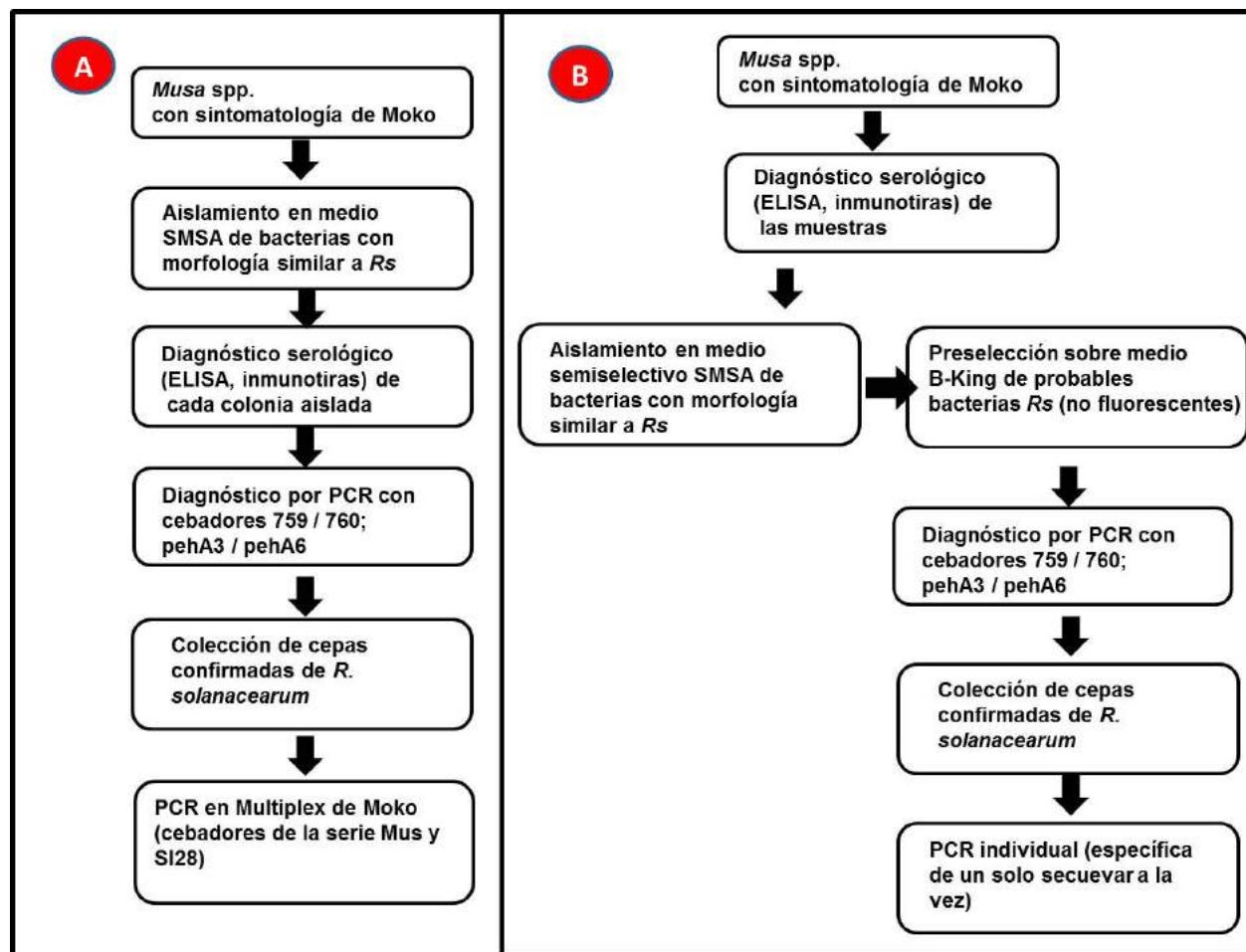


Figura 4. Comparación esquemática del protocolo generalmente usado para el aislamiento de *R. solanacearum* relacionadas a la enfermedad Moko (Panel A), y el protocolo recomendado en el presente estudio (panel B). El panel A se basa en Álvarez-Restrepo et al. (2008); Dööloltkeldieva y Bobusheva (2016); Hong et al. (2012); Sánchez-Pérez et al. (2008).

Figure 4. Schematic comparison of the protocol generally used for the isolation of *R. solanacearum* related to the Moko disease (Panel A), and the protocol recommended in the present study (panel B). Panel A is based on Álvarez-Restrepo et al. (2008); Dööloltkeldieva and Bobusheva (2016); Hong et al. (2012); Sánchez-Pérez et al. (2008).

seguido en otros trabajos (Figura 4A). El procedimiento 4A es más costoso debido a que el diagnóstico por ELISA o inmuntiras debe realizarse sobre cada colonia aislada. En este trabajo esa estrategia tuvo poco éxito. Cuando no se diagnosticaron las muestras previamente al aislamiento, una gran parte

(Dirección General de Sanidad Vegetal - DGSV), the National Food Health, Safety and Quality Service (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria - SENASICA) and the State Plant Health Committees (Comités Estatales de Sanidad Vegetal).

de las bacterias aisladas sobre el SMSA no fueron *R. solanacearum*. El uso secuencial de medio B-King después del aislamiento sobre SMSA es una opción rápida y económica que permite la preselección fenotípica de *R. solanacearum*. De acuerdo a la literatura los diagnósticos de identidad más confiables de *R. solanacearum* son la PCR y secuenciación, ya sea de ITS o de genes específicos (Fegan y Prior, 2005). Una vez confirmada la identidad de *R. solanacearum* la colección de bacterias aisladas puede ser caracterizada genéticamente, fenotípicamente, filogenéticamente, o usarse para otros estudios. Se recomienda realizar PCR individual con los iniciadores específicos de cada secuevar de Moko, en vez del Multiplex de Moko, cada vez que los resultados no sean claros.

Moko es una enfermedad bajo regulaciones cuarentenarias en México y se tiene establecida la campaña fitosanitaria, y por lo tanto se mantiene bajo continua vigilancia y medidas de erradicación de los brotes identificados. Es importante enfatizar que por normatividad y por seguridad alimentaria, es indispensable prevenir la dispersión del patógeno por colecta del material por personal inexperto. Por ello, todos los estudios que se realicen sobre este patógeno en México deberán ser llevados a cabo con el permiso y en colaboración con la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y los Comités Estatales de Sanidad Vegetal.

CONCLUSIONES

Se recomienda incluir el uso sistemático de inmunotiras para fortalecer el diagnóstico de *R. solanacearum* en campo.

El aislamiento e identificación de *R. solanacearum* es difícil, como han mencionado otros autores.

CONCLUSIONS

The systematic use of ImmunoStrips is recommended to strengthen the diagnosis of *R. solanacearum* in the field.

The isolation and identification of *R. solanacearum* is difficult, as other authors have mentioned. The modification of the procedure published in the bibliography for the isolation of *R. solanacearum* facilitated the bacterial isolation from diseases banana plants: the serological diagnosis of the suspicious samples, the systematic inclusion of the B-King medium to discard bacteria of the genus *Pseudomonas*, and the confirmative diagnosis by PCR with primers *pehA#3-F-pehA#6-R*, and *ISRso19F-ISRso19R*.

The detection of atypical results in the Multiplex PCR for Moko disease of banana must be interpreted with care. The results must be confirmed using individual (specific) PCRs for each sequevar.

Acknowledgements

This research was carried out with the authorization of the DGSV, SENASICA, Mexico. We would like to thank all the support given for this project by Dr. Francisco Javier Trujillo-Arriaga, Director of the DGSV, Dr. José Abel López-Buenfil, M.C. Oscar Morales-Galván and the staff of the Bacteriology Laboratory for Technical training of José Abraham Obrador Sánchez (JAOS) in the National Plant Health Reference Center (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria - CNRF). The authors would also like to thank the Tabasco Local Plant Health Committee (Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco - CESVETAB) for the sampling of banana plants with Moko symptoms, and the Phytosanitary Epidemiological Surveillance Program (Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria - PVEF) for the shipping of samples to our lab. This research was funded by the National Science and Technology Council (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACyT), with Project 60246 and scholarship

La modificación del procedimiento citado en la literatura para el aislamiento de *R. solanacearum* facilitó aislar la bacteria a partir de plátanos enfermos: el diagnóstico serológico de las muestras sospechosas, la inclusión sistemática del medio B-King para descartar bacterias del género *Pseudomonas*, y el diagnóstico confirmativo por PCR con los iniciadores pehA#3-F -pehA#6-R, e ISRso19F-ISRso19R.

La detección de resultados atípicos en la PCR Multiplex para Moko debe interpretarse con cuidado. Los resultados deben confirmarse empleando PCRs individuales (específicas) para cada secuencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con autorización de la DGSV, SENASICA, México. Reconocemos todo el apoyo para este proyecto del Dr. Francisco Javier Trujillo-Arriaga, Director de la DGSV, del Dr. José Abel López-Buenfil, M.C. Oscar Morales-Galván y el personal del laboratorio de Bacteriología para la formación técnica de José Abraham Obrador Sánchez (JAOS) en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF). Los autores también desean expresar su agradecimiento al Comité Local de Sanidad Vegetal de Tabasco (CES-VETAB) por el muestreo de tejidos de plantas de banano con síntomas de Moko, y al Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (PVEF) por el envío de muestras a nuestro laboratorio. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el Proyecto 60246 y la beca 344769 a JAOS, y parcialmente apoyado por el CONACyT proyecto 269833.

LITERATURA CITADA

Albuquerque GMR, Santos LA, Felix KC, Rollemberg CL, Silva AM, Souza EB, Cellier G, Prior P and Mariano RL. 2014. Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopathology* 104:1175-1182. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0334-R>

344769 to JAOS, and partially supported by CONACyT project 269833.

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

- Álvarez-Restrepo J, Rodríguez-Gaviria P y Marín-Montoya M. 2008. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agrosistemas bananeros de Colombia. *Tropical Plant Pathology* 33:197-203. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000300004>
- Cardozo C, Rodríguez P, Cotes JM y Marín M. 2010. Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia). Genetic variability of the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) in the banana-growing region of Uraba (Colombia). *Revista de Biología Tropical* 58:31-44. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v58i1.5192>
- Champoiseau PG, Jones JB, and Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Disponible en línea: *Plant Health Progress* <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2009-0313-01-RV>
- CNRF, 2012. Protocolo de diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (filotipo II) causante del Moko del plátano. SAGARPA -SENASICA. Estandarizado en proceso de revisión. Dirección General de Sanidad Vegetal - Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México. 30p.
- Denny T and Hayward AC. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minn., USA. 174p.
- Deberdt P, Guyot J, Coranson-Beaudu R, Launay J, Noreksal M, Riviere P, Vigne F, Laplace D, Lebreton L and Wicker E. 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the “emerging ecotype”. *Phytopathology* 104:586–596. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0264-R>
- Dööltokeidieva T and Bobuşeva S. 2014. Identification and prevalence of *Ralstonia solanacearum* from potato fields of Kyrgyzstan. *Journal of Agriculture and Life Science* 4:1-9. Disponible en línea: <http://journals.manas.edu.kg/mjavl/index.php/mjavl/article/view/11/11>
- Dööltokeidieva T and Bobuşeva S. 2016. Identification of *Ralstonia solanacearum* in Kyrgyzstan's potato fields and the possibility of using biocontrol agents against this pathogen. *International Journal of Environmental y Agriculture Research* 2(5):146-155. Disponible en línea: <http://ijoeear.com/Paper-May-2016/IJOEAR-MAY-2016-42.pdf>
- Dulla GFJ and Lindow SE. 2009. Acyl-homoserine lactone-mediated cross talk among epiphytic bacteria modulates behavior of *Pseudomonas syringae* on leaves. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 3:825-834. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.30>
- Eriksson E and Aspan A. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research* 3:21 <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-3-21>



- Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK and Stead DE. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO/OEPP Bulletin 26:663–678. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/229943089\\_Sensitivity\\_of\\_different\\_methods\\_for\\_the\\_detection\\_of\\_Ralstonia\\_solanacearum\\_in\\_potato\\_tuber\\_extract](https://www.researchgate.net/publication/229943089_Sensitivity_of_different_methods_for_the_detection_of_Ralstonia_solanacearum_in_potato_tuber_extract)
- FAO, 2014. Banana market review 2013-2014. Banana Information Note 2014 8p. Disponible en línea: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Bananas/Documents/Banana\\_Information\\_Note\\_2014\\_rev.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/Banana_Information_Note_2014_rev.pdf)
- FAO, 2017. Banana statistical compendium 2015-2016. 26p. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a-i7409e.pdf>
- Fegan M and Prior P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. Pp 1-15. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Minnesota, American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minn., USA. 386p
- French EB, Gutarra L, Aley P and Elphinstone J. 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. Fitopatologia 30:126-30. Disponible en línea: <https://betuco.be/Potato/Bacterial%20wilt%20-%20culture%20media%20of%20Ralstonia%20Solanacearum.pdf>
- Ganan STS, Nietsche S, Pereira MCT, Reis ST, Xavier AA, Santos TM and Fernandes TP. 2009. Microbial contamination in explants of banana cultivars ‘galil 18’ and ‘tropical’. Acta Horticulturae 829:341-344. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.829.53>
- Gillings M, Fahy P and Davies C. 1993. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. Letters in Applied Microbiology 17:44-48. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01432.x>
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27: 265-277. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x>
- Hong JC and Norman DJ, Reed DL, Momol MT, Jones JB, 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. Phytopathology 102: 924-936. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0342>
- Kalpage M and De Costa D. 2015. Isolation of bacteriophages and determination of their efficiency in controlling *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. Tropical Agricultural Research 26:140-151. <http://dx.doi.org/10.4038/tar.v26i1.8079>
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *P. solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695. Disponible en línea: <http://garfield.library.upenn.edu/classics/1983/A1983QM45400001.pdf>
- King EO, Ward MK and Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44:301-307.
- Korus KA. 2007. Evaluating commercially available diagnostic tests for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. nebraskensis, cause of Goss’s bacterial wilt and leaf blight in corn. Tesis de Maestría. Universidad de Nebraska. 73p. Disponible en línea: [http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1025&context=agronhor\\_tdiiss](http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1025&context=agronhor_tdiiss)
- Lamichhane JR and Varvaro L. 2013. A new medium for the detection of fluorescent pigment production by pseudomonads. Plant Pathology 62:624-632. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02670.x>
- Lee Y-A and Chin N-K. 2003. A novel Insertion sequence, ISRso19, isolated from *Ralstonia solanacearum* and its application to race differentiation. Plant Pathology Bulletin 12:57-64. <http://dx.doi.org/140.112.183.1/cpps/pdf/12-1/12-1-7>
- Li Y, Feng J, Liu H, Wang L, Hsiang T, Li X and Huang J. 2016. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* Causing Tobacco Bacterial Wilt in China. Plant Disease 100:1288-1296. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0384-RE>
- Naranjo Feliciano E y Martínez Zubiaur Y. 2013. Avances en el diagnóstico de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*): situación actual y perspectivas en Cuba. Revista de Protección Vegetal 28: 160-170. Disponible en línea: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000300001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300001)
- Nasim B. 2011. Biological diversity of *Ralstonia Solanacearum* strains causing Bacterial Wilt of solanaceous crops in Pakistan. Arid Agriculture University, Rawalpindi. 153p. Disponible en línea: <http://eprints.hec.gov.pk/7587/1/1063S.htm>
- Norman DJ, Huang Q, Yuen JMF, Mangravita-Novo A and Byrne D. 2009. Susceptibility of Geranium Cultivars to *Ralstonia solanacearum*. HortScience 44:1504-1508. Disponible en línea: <http://hortsci.ashspublishings.org/content/44/5/1504.full>
- Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang JF, Li TH, Maghirand R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW and Timmis JN. 1997. A novel method for development of species and strain – specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 5:19-33. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/37625749>
- Peeters N, Guidot A, Vailleau F and Valls M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Molecular Plant Pathology 14:651-662. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B and Allen C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. BMC Genomics 17:1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>
- Rajeshwari N, Shylaja MD, Krishnappa M, Shetty HS, Mortensen CN and Mathur SB. 1998. Development of ELISA for the detection of *Ralstonia solanacearum* in tomato: its application in seed health testing. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 697-704. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008892400077>
- Ramesh, R, Achari GA and Gaitonde S. 2014. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting solanaceous ve-

- getables from India reveals the existence of unknown or newer sequevars of Phylotype I strains. *European Journal of Plant Pathology* 140:543-562. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-014-0487-5>
- Raymundo AK, Aves-Ilagan Y and Denny TP. 1998. Analysis of genetic variation of a population of banana infecting strains of *Ralstonia solanacearum*. Pp: 56–60. In: Prior P, Allen C and Elphinstone J (eds.). *Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects*. Paris: INRA Editions.
- Ruiz-García N, Mora-Aguilera G, Rivas-Valencia P, Góngora-Canul C, Loeza-Kuk E, Ochoa-Martínez D, Ramírez-Valverde G, Gutiérrez-Espinosa MA and Álvarez-Ramos R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:41-47. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2009000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000100007)
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L and Kappler U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3087-3103. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>
- Sambrook J and Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America. 2100p.
- Sánchez-Pérez A, Mejía L, Fegan M and Allen C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathology* 57:320-331. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01769.x>
- SENASICA, 2015. Campaña contra el Moko de platano. Informe mensual No. 12 (Diciembre 2015). 6p. Disponible en línea: <http://cesavenay.org.mx/wp-content/uploads/Informes-Fisicos-Financieros/2015/12-IFF-DICIEMBRE-MOKO.PDF>
- SENASICA, 2016. Moko del plátano. *Ralstonia solanacearum* raza 2 Smith. Ficha técnica No. 3. 24p. Disponible en línea: [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/130955/Ficha\\_Técnica.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/130955/Ficha_Técnica.pdf)
- SENASICA, 2017. Campaña fitosanitaria Moko del plátano. Disponible en línea: <http://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/plaga-Moko-del-platano>. Fecha de consulta 04 de enero del 2017.
- SIAP. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Disponible en línea: <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. (consulta, enero 2017).
- Sequeira L. 1998. Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. Pp 6-14. In: Prior P, Ass CA, Elphinstone J (eds). *Bacterial Wilt Disease*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 145p.
- Smith EF. 1896. A bacterial disease of tomato, pepper, egg-plant, and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). U. S. Dept. Agric. Div. Vegetable Physiol. Pathol. Bulletin 12:1-28. Disponible en línea: <https://archive.org/stream/bacterialdisease12smit#page/n1/mode/2up>
- Souza SA, Xavier AA, Costa MR, Cardoso AMS, Pereira MCT and Nietsche S. 2013. Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology* 36:252-264. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572013000200016>
- Thera AT, 2007. Bacterial wilt management: a prerequisite for a potato seed certification program in Mali. Montana State University-Bozeman, College of Agriculture. 142p. Disponible en línea: <http://scholarworks.montana.edu/xmlui/bitstream/handle/1/2415/TheraA1207.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Thomas P, Swarna GK, Roy PK and Patil P. 2008. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93:55-63. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9341-9>
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M and Prior P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6790-6801. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00841-07>
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D and Prior P. 2009. Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathology* 58:853–861. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02098.x>
- Workman D. 2017. Bananas Exports by Country. Disponible en línea: <http://www.worldstopexports.com/bananas-exports-country/>. Fecha de consulta 24 de julio del 2017.

# Genetic resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in selected maize (*Zea mays* L.) lines with white and yellow endosperm

## Resistencia genética a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en líneas seleccionadas de maíz (*Zea mays* L.) con endospermo blanco y amarillo

Andrés Quezada-Salinas, Magnolia Moreno-Velázquez, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Unidad Integral de Diagnóstico, Servicios y Constatación. Carretera Federal México-Pachuca km. 37.5, Tecámac, Edo. Méx., C.P. 55740, México; Carlos De León-García de Alba\*, Cristian Nava-Díaz, Alma Rosa Solano-Báez, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Tezcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. Méx., C.P. 56230, México. \*Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 15 de Mayo, 2017.

Aceptado: 28 de Julio, 2017.

Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C, Solano-Báez AR. 2017. Genetic resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in selected maize (*Zea mays* L.) lines with white and yellow endosperm. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 534-548.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1705-2

Primera publicación DOI: 01 de Septiembre, 2017.

First DOI publication: September 01, 2017.

**Resumen.** El carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) del maíz (*Zea mays* L.) es una enfermedad de gran importancia que se presenta en zonas productoras de maíz, incluyendo los Valles del Mezquital y Toluca. El objetivo del presente estudio fue identificar líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> de maíz adaptadas al Altiplano de México para ser utilizadas en un programa de mejoramiento de resistencia y buenas características agronómicas. Semillas de cada línea se inocularon con una

**Abstract.** Head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) of maize (*Zea mays* L.) is an important disease present in Mexico, including the Mezquital and Toluca Valleys. The objective of this research was to identify C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> maize lines adapted to Mexican highlands to be used in a breeding program for disease resistance and good agronomic characters. Seed of lines were inoculated with a suspension of 7x10<sup>7</sup> teliospores mL<sup>-1</sup> of *S. reilianum* f. sp. *zeae* with 1% sodium carboxymethyl cellulose and planted in a greenhouse. Plants were monitored until tassel stage, when disease incidence was recorded. In 258 C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white endosperm showed an incidence of 92.3% and 41.7% in 71 lines with yellow endosperm. Based on disease incidence and agronomic characters, 38 and 24 C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white and yellow endosperm, respectively, were selected and self-pollinated in the field. A total of 123 and 114 C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> lines with white and yellow endosperm, respectively, inoculated with teliospores of the pathogen showed incidence of the disease up

suspensión de  $1.7 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* en 1% de carboximetilcelulosa de sodio y se sembraron en invernadero. Las plantas fueron monitoreadas hasta la formación de espiga, donde se evaluó la incidencia. En 258 líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de endospermo blanco se presentó hasta 92.3% de incidencia y hasta 41.7% en 71 líneas de endospermo amarillo. Con base en la incidencia y características agronómicas, se seleccionaron y autofecundaron en campo 38 líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de endospermo blanco y 24 de endospermo amarillo. Un total de 123 y 114 líneas C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> de endospermo blanco y amarillo, respectivamente, fueron inoculadas con teliosporas del patógeno y presentaron una incidencia de la enfermedad de hasta 42.8% y 28.5%, respectivamente. La inoculación con teliosporas y siembra en invernadero permitió identificar líneas de maíz con diferente porcentaje de infección y seleccionar las líneas resistentes, probando la eficiencia de ésta técnica.

**Palabras clave:** *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, *Zea mays*, carbón de la espiga, inoculación de semilla, líneas resistentes.

## INTRODUCCION

El maíz (*Zea mays* L.) es susceptible a enfermedades en diferentes etapas de su desarrollo. El carbón de la espiga, causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon y Fullerton, sinónimo *Sphacelotheca reiliana* (Khün) Clint. (Matyac y Kommedahl, 1985a; Matyac y Kommedahl, 1985b) es un problema serio desde la década de 1970 en EE.UU., México, Australia, China, Sudáfrica y Francia (Stromberg, 1981; Bernardo *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2000).

Los síntomas del carbón de la espiga son visibles en la floración, aun cuando el patógeno infecta

to 42.8% and 28.5%, respectively. Inoculation with teliospores and planting in the greenhouse resulted in the identification of maize lines with different percentages of infection allowing the selection of resistant lines, proving the efficiency of the technique.

**Key words:** *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, *Zea mays*, head smut, seed inoculation, resistant lines.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is susceptible to diseases in different stages of its development. Head smut, caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon and Fullerton, synonym *Sphacelotheca reiliana* (Khün) Clint. (Matyac and Kommedahl, 1985a; Matyac and Kommedahl, 1985b) has been a serious problem since the 1970s in the U.S.A., Mexico, Australia, China, South Africa, and France (Stromberg, 1981; Bernardo *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2000).

The symptoms of head smut are visible in flowering stage, even when the pathogen infects the root during germination and in the first stages of seedling development (Martínez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2015). The infective mycelium invades the tissues systematically until it reaches the apical meristem (Frederiksen and Reyes, 1980; Martínez *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2015). The main damages are caused during flowering, when the mycelium established in the meristem produces sori that replace grains in the ear (female inflorescence) and anthers. When maturing, the sori release teliospores that fall to the ground and are carried short distances by the wind (Montes and Díaz, 2006; Ghareeb *et al.*, 2011).

Because the inoculum is found in the soil, efforts to fight this disease are focussed on avoiding infection

la raíz durante la germinación y primeras etapas de desarrollo de la plántula (Martínez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2015). El micelio infectivo invade sistémicamente los tejidos, hasta llegar al meristemo apical (Frederiksen y Reyes, 1980; Martínez *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2015). El daño principal lo ocasiona durante la floración, cuando el micelio establecido en el meristemo produce soros que reemplazan granos en mazorca (inflorescencia femenina) y anteras. Al madurar, los soros liberan las teliosporas, que caen al suelo y el aire las transporta a distancias cortas (Montes y Díaz, 2006; Ghareeb *et al.*, 2011).

Debido a que el inóculo se encuentra en el suelo de cultivo, los esfuerzos por combatir a ésta enfermedad se enfocan en evitar la infección durante el desarrollo de la plántula. Para esto, se utilizan estrategias de control como el tratamiento de semilla con fungicidas (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez y Ledesma, 1990; Pradhanang y Ghimire, 1996; Wright *et al.*, 2006), prácticas culturales (Mack *et al.*, 1984; Matyac y Kommedahl, 1985a) y la resistencia del hospedante (Baggett y Koepsell, 1983; Stromberg *et al.*, 1984; Song *et al.*, 2000; Aquino *et al.*, 2011). Esta última es la estrategia más conveniente evitando daños ecológicos y reducir costos de producción.

Entre los estudios efectuados para identificar genotipos resistentes al carbón de la espiga destacan los realizados en Sudáfrica (Krüger, 1962), EE.UU. (Baggett y Koepsell, 1983), Kenya (Njuguna y Odhiambo, 1989), Francia (Lübberstedt *et al.*, 1999) y China (Duan *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2008). En México, a pesar de ser una enfermedad importante en los Valles Altos (Estados de Hidalgo y de México), los programas de mejoramiento no contemplan la selección para resistencia y solamente se han enfocado a determinar porcentajes de incidencia en híbridos y variedades de maíz (Pérez y Bobadilla, 2002 y 2003; Aquino *et al.*, 2011), en condiciones de infección natural (Quezada *et al.*, 2013).

during seedling development. In order to do this, several strategies are used, such as treating seeds with fungicides (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez and Ledesma, 1990; Pradhanang and Ghimire, 1996; Wright *et al.*, 2006), cultural practices (Mack *et al.*, 1984; Matyac and Kommedahl, 1985a), and host resistance (Baggett and Koepsell, 1983; Stromberg *et al.*, 1984; Song *et al.*, 2000; Aquino *et al.*, 2011). The latter is the most convenient technology, since it avoids environmental damages and reduces costs of production.

Among the studies carried out to identify genotypes resistant to head smut, some of the most important are those performed in South Africa (Krüger, 1962), the United States (Baggett and Koepsell, 1983), Kenya (Njuguna and Odhiambo, 1989), France (Lübberstedt *et al.*, 1999), and China (Duan *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2008). In Mexico, despite the importance of this disease in Valles Altos (States of Hidalgo and Mexico), breeding programs do not contemplate the selection for resistance and have only focused on determining percentages of incidence in hybrids and maize varieties (Pérez and Bobadilla, 2002 and 2003; Aquino *et al.*, 2011), under natural infection conditions (Quezada *et al.*, 2013).

In 2006 and 2007, the “National Food Health, Safety and Quality Service” (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad - SENASICA), and the “General Board for Plant Health – DGSV” (Dirección General de Sanidad Vegetal), and the Colegio de Postgraduados (CP), created the genetic improvement programs PM0531 and PM0542, which included the selection of maize populations and lines with head smut resistance for Valles Altos. In the states of Mexico and Hidalgo, maize populations were formed with a wide genetic base of white or yellow endosperm, with the aim of selecting material resistant to *S. reilianum* f. sp. *zaae* implementing a S<sub>1</sub> recurrent selection program.

En 2006 y 2007, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA), la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y el Colegio de Postgraduados (CP), crearon los proyectos de mejoramiento genético PM0531 y PM0542 en los que se incluyó la selección de poblaciones y líneas de maíz con resistencia al carbón de la espiga para los Valles Altos. En los Estados de México e Hidalgo se formaron poblaciones de maíz con amplia base genética de endospermo blanco y amarillo con el propósito de seleccionar materiales resistentes a *S. reilianum* f. sp. *zeae* implementando un programa de selección recurrente.

Los métodos de selección recurrente de progenies o líneas autofecundadas  $S_1$  y  $S_2$ , son los más usados para mejorar la resistencia a plagas y enfermedades; además de incrementar su eficiencia aumentando la frecuencia de genes favorables de una o más características agronómicas bajo selección y mantiene la variabilidad genética para continuar la selección (Hallauer y Miranda, 1988; Hallauer, 1992). La variación genética presente en las líneas autofecundadas permite seleccionar diferente nivel de susceptibilidad al patógeno. Así, el objetivo del presente estudio fue el de evaluar el nivel de resistencia o susceptibilidad de líneas  $C_2-S_1$  y  $C_2-S_2$  de maíz inoculadas artificialmente con teliosporas del patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Hospedante

La formación de poblaciones base de maíz de endospermo blanco y amarillo se inició ( $C_0$ ) en el ciclo primavera-verano de 2007 recombinando varias fuentes de germoplasma deseable en un vivero en el ejido de Cinta Larga, Hgo. ( $20^{\circ} 13' 47''$  N,  $99^{\circ} 12' 52''$  O), seleccionado por la alta incidencia

The recurrent selection method involving  $S_1$  or  $S_2$  lines are the most widely used to improve resistance to pests and diseases; they also increase their efficiency by increasing the frequency of favorable genes of one or more agronomic characteristics under selection while maintaining genetic variability to continue the selection (Hallauer and Miranda, 1988; Hallauer, 1992). The genetic variation present in open-pollinated crops helps select different levels of susceptibility to the pathogen. Therefore, the aim of this study was to evaluate the level of resistance or susceptibility of maize  $C_2-S_1$  lines artificially inoculated with teliospores of the pathogen.

## MATERIALS AND METHODS

### Host

The formation of base maize populations with white or yellow endosperms began ( $C_0$ ) in the Spring-Summer cycle 2007, by recombining several sources of desirable germplasm in a nursery established in the *ejido* of Cinta Larga, Hgo. ( $20^{\circ} 13' 47''$  N,  $99^{\circ} 12' 52''$  O), selected due to its high incidence of head smut under natural conditions. In the Autumn-Winter cycle 2007/08, in a nursery established in a farmer's plot in Valle de Bravo, Mex. ( $19^{\circ} 11' 42''$  N,  $100^{\circ} 07' 52''$  O), the  $C_0$  seeds were planted, and best plants were self-pollinated obtaining the  $C_0-S_1$  seed. The nursery in Valle de Bravo, Mex. was established due to the presence of head smut and to advance a planting season under subtropical conditions without frost.

From this cycle onwards, a  $S_1$  population improvement program was followed, recombining  $S_1$  families selected for agronomic characters and resistance to head smut in the Spring-Summer cycle in Hidalgo and generating new  $S_1$  lines in the Autumn-Winter cycle in Valle de Bravo, Mex.

de carbón de la espiga (panoja) en condiciones naturales. En el ciclo otoño-invierno 2007/08, en un vivero establecido en el municipio de Valle de Bravo, Méx. (19° 11' 42" N, 100° 07' 52" O), se sembraron las mazorcas de medios hermanos, se autofecundaron las mejores plantas y se obtuvo la semilla C<sub>0</sub>-S<sub>1</sub>. El vivero en Valle de Bravo, Méx. se estableció por la presencia de carbón de la espiga y para avanzar una temporada de siembra en condiciones subtropicales sin heladas.

A partir de éste ciclo, se siguió el método de mejoramiento poblacional de S<sub>1</sub> recurrente recombinando las familias S<sub>1</sub> en el ciclo primavera-verano en Hidalgo y generando nuevas líneas S<sub>1</sub> en el ciclo otoño-invierno en Valle de Bravo, Méx.

En 2009 se completaron dos ciclos de mejoramiento obteniéndose semilla C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>, con un total de 258 líneas de endospermo blanco y 71 de endospermo amarillo. En éstas líneas se evaluó la respuesta a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* mediante inoculación artificial de semillas y siembra en invernadero.

En 2010, en el vivero en el Estado de Hidalgo, se sembraron las líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>, las cuales se recombinaron y autofecundaron y se obtuvo semilla C<sub>3</sub> y C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>. Para obtener la semilla C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, se seleccionaron las mejores líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> en base a características agronómicas con una presión de selección al carbón de la espiga entre 0 a 7.7% de incidencia en las líneas de endospermo blanco y de 0 a 12.5% en las de endospermo amarillo. El porcentaje de incidencia fue el resultado de la evaluación en condiciones de invernadero previamente descrito. Seis o siete plantas de las líneas seleccionadas se autofecundaron para obtener semilla C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>. Después de cosecha, semillas de 123 y 114 mazorcas C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> de endospermo blanco y amarillo, respectivamente, se inocularon, se sembraron en invernadero y se evaluaron por su resistencia al patógeno.

In 2009, two breeding cycles were completed, resulting in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> seed with a total of 258 lines of white endosperm, and 71 lines of yellow endosperm. In these lines, the response to infection by *S. reilianum* f. sp. *zeae* was evaluated by artificial inoculation of seeds and crops in greenhouse conditions.

In 2010, in the state of Hidalgo, C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines were planted and were simultaneously recombined and self-pollinated, resulting in C<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> seeds. To obtain the C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> seed, six or seven plants of the best artificially inoculated C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines were selected based on agronomic traits with a pressure of selection to head smut with 0 to 7.7% of incidence in the lines of white endosperm and 0 to 12.5% in the lines of yellow endosperm. After harvest, seeds from 123 and 114 C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> ears with white or yellow endosperm, respectively, were inoculated, planted in the greenhouse, and evaluated for resistance to the pathogen.

### Pathogen

The study used *S. reilianum* f. sp. *zeae* teliospores obtained from tassels and ears of maize plants infected in natural conditions in the state of Hidalgo. The teliospores were disinfested in a 1% CuSO<sub>4</sub> solution for 24 h, washed with three changes of sterile distilled water and recovered in filter paper for drying.

To determine the viability of the inoculum, a suspension of teliospores was prepared with a concentration of 50 000 teliospores mL<sup>-1</sup> in sterile distilled water and 0.5 mL of this suspension was spread in Petri dishes with a PDA medium. The dishes were incubated at 25 °C in darkness. The percentage of germination was determined after 96 h counting 4 compound microscope fields (40X), and the percentage of germinated teliospores was recorded.

## Patógeno

En el estudio se usaron teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* obtenidas de espigas y mazorcas de plantas de maíz infectadas naturalmente en el estado de Hidalgo. Las teliosporas se desinfectaron en una solución de 1% de  $\text{CuSO}_4$  por 24 h, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se recuperaron en papel filtro para su secado.

Para determinar la viabilidad del inóculo se preparó una suspensión de teliosporas con una concentración de 50,000 teliosporas  $\text{mL}^{-1}$  en agua destilada estéril. 0.5 mL de la suspensión se colocó y dispersó en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad. El porcentaje de germinación se determinó a las 96 h en 4 campos de microscopio compuesto (40X), registrando el porcentaje de teliosporas germinadas.

## Inoculación del hospedante

Una suspensión de teliosporas a una concentración de  $1.7 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  se preparó en agua destilada estéril con carboximetilcelulosa de sodio como adherente (NaCMC; Droguería Metropolitana, México, D. F.). Las semillas de maíz (22 por cada línea), se sumergieron por 1 min en esta suspensión y se secaron a 22 °C durante 48 h. Como testigo y fuente de comparación se usaron semillas del híbrido susceptible AS-910.

Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con suelo esterilizado, a una profundidad de 2 cm. El suelo tenía pH 8.0, conductividad eléctrica de  $5.08 \text{ dSm}^{-1}$ , 3.23% de materia orgánica y textura franco-arenosa (arena 75.6%, limo 14.5% y arcilla 9.9%). Las macetas (40 cm de ancho x 40 cm de altura) se colocaron en invernadero distribuidas en un diseño completamente al azar, los tratamientos fueron 123 líneas de endospermo blanco y 114 de endospermo amarillo. La unidad experimental fue

## Inoculation of the host

A suspension of teliospores at a concentration of  $1.7 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$  was prepared in sterile distilled water with sodium carboxymethylcellulose as a sticker (NaCMC; Droguería Metropolitana, Mexico, D. F.). Twenty two seeds of each maize line, were submerged for 1 min in this suspension of teliospores and dried at 22 °C during 48 h. As a control and source of comparison, seed of the susceptible hybrid AS-910 was used.

The inoculated seeds were planted in pots with sterilized soils at a depth of 2 cm. The soil had a pH of 8.0, electric conductivity of  $5.08 \text{ dSm}^{-1}$ , 3.23% of organic matter and a sandy-loam texture (sand 75.6%, lime 14.5%, and clay 9.9%). The pots (40 cm wide x 40 cm high) were placed in a greenhouse and distributed in a completely randomized. The treatments were 123 lines of white endosperm and 114 of yellow endosperm. The experimental unit was a pot with 22 plants and 2 repetitions per treatment. After planting, the pots were watered at field capacity. Temperature and moisture in the greenhouse and soil were taken with a data recorder (WatchDog Micro Station, Spectrum Technologies Inc.).

## Evaluation of the incidence of the disease

In  $C_2-S_1$  and  $C_2-S_2$  lines, resistance and susceptibility were recorded during flowering by visual observation of the symptoms of smut, both in the ear and tassel of the plants of each line. A plant was considered as susceptible when presented sori in the ear, tassel, or both.

The percentage of incidence was determined as the quotient between plants with symptoms and the total of plants in the experimental unit, multiplied by 100; later, these values were transformed by arcsine to homogenize the variances. According to



una maceta con 22 plantas y dos repeticiones por tratamiento. Después de la siembra, las macetas se regaron a capacidad de campo. Temperatura y humedad dentro del invernadero y del suelo se midieron con un registrador de datos (WatchDog Micro Station, Spectrum Technologies Inc.).

### Evaluación de la incidencia de la enfermedad

En líneas  $C_2-S_1$  y  $C_2-S_2$ , la susceptibilidad y resistencia se registraron durante la floración por observación visual de síntomas del carbón tanto en la mazorca como en la espiga de las plantas de cada línea. Una planta susceptible fue aquella con presencia de soros en la espiga, en la mazorca o ambas.

El porcentaje de incidencia se determinó como el cociente entre plantas con síntomas y el total de plantas en la unidad experimental multiplicado por 100; después se transformaron por arcoseno para homogeneizar las varianzas. De acuerdo a la incidencia, las líneas se clasificaron siguiendo la escala: 0%=altamente resistente, 11-25%= moderadamente resistente, 26-50%= moderadamente susceptible, 51-75%= susceptible y 76-100%= altamente susceptible. Los datos se analizaron utilizando el sistema de análisis SAS y comparación de medias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* utilizadas como inóculo presentaron germinación de 31% después de 96 h de incubación en oscuridad a 25 °C. La infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* se identificó por la presencia de soros en la espiga, en donde las flores fueron reemplazadas por masas de teliosporas. En plantas infectadas se observaron espigas compactas (Figura 1A), con proliferación de espiguillas y presencia de teliosporas de color

the incidence, the lines were classified according to the following scale: 0%=highly resistant, 11-25%= moderately resistant, 26-50%= moderately susceptible, 51-75%= susceptible, and 76-100%= highly susceptible. The data were analyzed using the SAS analysis system and a mean comparison.

## RESULTS AND DISCUSSION

The *S. reilianum* f. sp. *zeae* teliospores used as an inoculum presented a germination of 31% after 96 h of incubation in darkness at 25 °C. The infection by *S. reilianum* f. sp. *zeae* was identified by the presence of sori in the ears, where kernels were replaced by masses of teliospores. In infected plants, ears were small (Figure 1A), with the proliferation of bracts and presence of the black masses of teliospores. To observe the infection in the ear, it was necessary to cut them in half lengthwise; in infected ears, teliospores developed inside these sori, grouped in a black mass (Figure 1B). The symptoms and signs observed in the tassel and ear coincide with those reported by White (1999) and Baggett and Kean (1989).

The plants developing symptoms and signs determined the percentage of incidence of the disease in the  $C_2-S_1$  and  $C_2-S_2$  lines evaluated.

### Evaluation of incidence in lines $C_2-S_1$

In the lines with white endosperm, only one was highly susceptible to the disease, with an incidence of 92.3%. In the yellow endosperm lines, the highest incidence values were moderately susceptible with 28.6, 30, 33.3, and 40%. The frequency of the disease in the 258  $C_2-S_1$  lines with white endosperm and 71  $C_2-S_1$  lines with yellow endosperm is shown in Figures 1 and 2, and the analysis of variance included in Table 1, showing



**Figura 1.** Síntomas y signos del carbón de la espiga presentes en plantas de maíz provenientes de semilla inoculada con una suspensión de teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* de  $1.7 \times 10^7$  teliosporas  $\text{mL}^{-1}$  a 1% de carboximetilcelulosa de sodio y sembradas en invernadero. A) Formación de soros en la espiga. B) Formación de soros en la mazorca.

**Figure 1.** Symptoms and signs of head smut present in maize plants after seeds were inoculated with a suspension of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* with  $1.7 \times 10^7$  teliospores  $\text{mL}^{-1}$  in a 1% sodium carboxymethylcellulose and planted in the greenhouse. A) Formation of sori in the tassel. B) Formation of sori in the ear.

negro. Para observar la infección en la mazorca, fue necesario cortarlas a la mitad en sentido longitudinal; en las mazorcas infectadas se desarrollaron soros, dentro de estos teliosporas agrupadas en una masa de color negro (Figura 1B). Los síntomas y signos observados en la espiga y mazorca coinciden con los reportados por White (1999) y Baggett and Kean (1989).

Las plantas que presentaron síntomas y signos sirvieron para determinar el porcentaje de incidencia de la enfermedad en las líneas  $C_2-S_1$  y  $C_2-S_2$  evaluadas.

#### Evaluación de incidencia en líneas $C_2-S_1$

Entre las líneas con endosperma blanco solamente una fue altamente susceptible a la enfermedad presentando una incidencia de 92.3%. En las líneas de endospermo amarillo, los valores más altos de incidencia fueron de moderadamente susceptibles con valores de 28.6, 30, 33.3 y 40%. La frecuencia de la enfermedad en las 258 líneas  $C_2-S_1$  de endospermo blanco y 71 líneas  $C_2-S_1$  de endospermo amarillo se presenta en las Figuras 2 y 3 y

that only one line with white endosperm presented an average incidence value of 92.3%, higher than the control, with incidence of 77.8% of the disease.

In the greenhouse, average temperatures for soil and environment were 19.4 and 22.1°C, respectively, and a relative humidity of 70%, adequate conditions for the development of the disease.

Lines with the greatest susceptibility to the disease had up to 92.3 and 40% of incidence in white or yellow endosperm maize, respectively. These results suggest that maize with white endosperm is more susceptible than those with yellow endosperm.

The frequency of the disease in the 258 inoculated lines with white endosperm was: 106 lines (41.1%) did not show the disease, 47 (18.2%) had an incidence of 1-10%, 58 (22.5%) with an incidence of 11-20%, 46 (17.8%) with an incidence of 21-70%, only one line had an average incidence value of 92.3%, greater than in the control which had a value of 77.8% of disease incidence.

In the case of the 71  $S_1$  yellow endosperm lines, the distribution of the incidence was: 35 lines

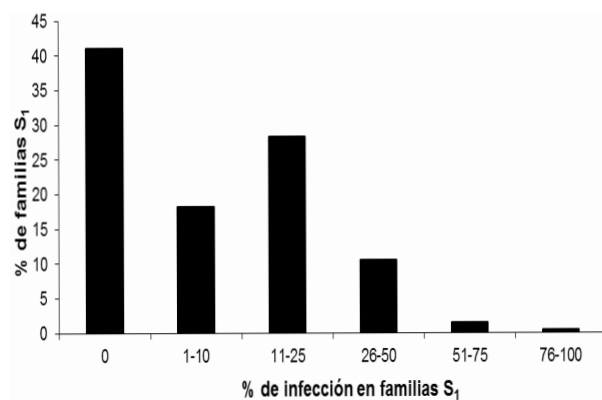


Figura 2. Frecuencia de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de endospermo blanco.  
Figure 2. Frequency distribution of incidence of head smut in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white endosperm.

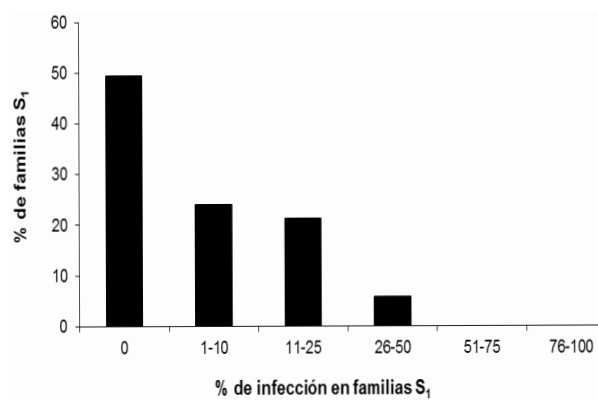


Figura 3. Frecuencia de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de endospermo amarillo.  
Figure 3. Frequency distribution of incidence of head smut in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with yellow endosperm.

los valores del análisis de varianza se incluyen en el Cuadro 1, mostrando que solamente una línea de endospermo blanco presentó un valor promedio de incidencia de 92.3% superando al testigo que mostró un valor de 77.8% de incidencia de la enfermedad.

Las temperaturas promedio para suelo y ambiente fueron de 19.4 y 22.1 °C, respectivamente, y una humedad relativa de 70%, condiciones adecuadas para el desarrollo de la enfermedad.

Las líneas más susceptibles a la enfermedad presentaron valores de hasta 92.3 y 40% de incidencia en maíz de endospermo blanco y amarillo, respectivamente. Estos resultados sugieren que maíces con endospermo blanco son más susceptibles que los de endospermo amarillo.

La frecuencia de la enfermedad en las 258 líneas de endospermo blanco inoculadas fue: 106 líneas (41.1%) no presentaron la enfermedad, 47 (18.2%) con incidencia de 1-10%, 58 (22.5%) con incidencia de 11-20%, 46 (17.8 %) con incidencia entre 21-70%, solamente una línea presentó un valor promedio de incidencia de 92.3% superando al testigo que mostró un valor de 77.8% de incidencia de la enfermedad.

(49.3%) did not show the disease, 17 (23.9%) had an incidence of 1-10%, 13 (18.3%) had an incidence of 11-20%, and 6 (8.4%) had an incidence of 21-40%. In the greenhouse, the average temperature values

Cuadro 1. Respuesta de líneas S<sub>1</sub> de endospermo blanco y amarillo a la infección por carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*) con inoculación artificial de la semilla.

Table 1. Response of S<sub>1</sub> lines with white or yellow endosperm to the infection of head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*) with artificial seed inoculation.

| Incidencia de la enfermedad (%) | Líneas de endospermo blanco (258) | Líneas de endospermo amarillo (71) |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 0                               | 106                               | 35                                 |
| 1-10                            | 47                                | 17                                 |
| 11-25                           | 73                                | 15                                 |
| 26-50                           | 27                                | 4                                  |
| 51-75                           | 4                                 | 0                                  |
| 76-100                          | 1                                 | 0                                  |
| Incidencia media                | 11.2                              | 10.18                              |
| Incidencia mínima               | 0                                 | 0                                  |
| Incidencia máxima               | 92.3                              | 40.0                               |
| Desviación estándar             | 15.91                             | 14.32                              |
| DMS (5%)                        | 34.3                              | 34.58                              |
| CV (%)                          | 64.19                             | 77.74                              |
| R <sup>2</sup>                  | 0.89                              | 0.84                               |

En el caso de las 71 líneas  $S_1$  de endospermo amarillo, la distribución de la incidencia fue: 35 líneas (49.3%) no presentaron la enfermedad, 17 (23.9%) con incidencia entre 1-10%, 13 (18.3%) con incidencia entre 11-20% y 6 (8.4%) con incidencia entre 21-40%. Los valores promedio de temperatura fueron de 19.4 y 22.1 °C para el suelo y ambiente, respectivamente, con una humedad relativa de 70%. Estos valores fueron conductivos para el desarrollo de la enfermedad.

### Evaluación de incidencia en líneas $C_2$ - $S_2$

La mayor incidencia del carbón de la espiga en líneas  $C_2$ - $S_2$  con endospermo blanco fue 42.8% y hasta 28.5% en las líneas de endospermo amarillo, mientras que en el testigo la incidencia fue 86.1%.

De las 123 líneas de endospermo blanco, 98 (79.7%) no mostraron la enfermedad y en las 114 líneas de endospermo amarillo, 84 (73.7%) no presentaron la enfermedad (Cuadro 2). La frecuencia de la enfermedad en las líneas  $S_2$  de endospermo blanco y amarillo se presenta en las Figuras 4 y 5. El análisis de varianza se muestra en el Cuadro 2.

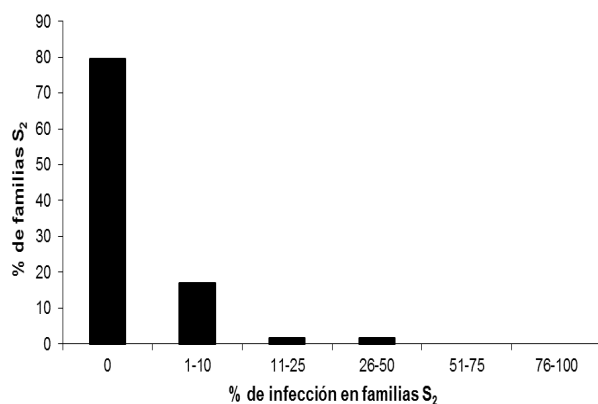


Figura 4. Distribución de la incidencia de carbón de la espiga en líneas  $C_2$ - $S_2$  de endospermo blanco.  
Figure 4. Frequency distribution of incidence of head smut in  $C_2$ - $S_1$  lines with white endosperm.

were 19.4 and 22.1 °C for soil and environment, respectively, and a relative humidity of 70%. These values were favourable for disease development.

### Evaluation of incidence in $C_2$ - $S_2$ lines

The highest head smut incidence in the tassel in  $C_2$ - $S_2$  lines with white endosperm was 42.8% and up to 28.5% in yellow endosperm lines, whereas in the control the incidence was 86.1%.

Out of the 123 lines with white endosperm, 98 (79.7%) did not show the disease and in the 114 yellow endosperm lines, 84 (73.7%) did not show the disease (Table 2). The frequency of the disease in  $C_2$ - $S_2$  lines with white and yellow endosperm is shown in Figures 3 and 4. The analysis of variance is shown in Table 2.

In the greenhouse, during the development of this study, average temperatures of 18.47 °C and 21.61 °C were recorded in the soil and in the environment, respectively, and an average relative humidity of 69.76%.

The response of maize plants to infection by *S. reilianum* f. sp. *zaae* has been evaluated with

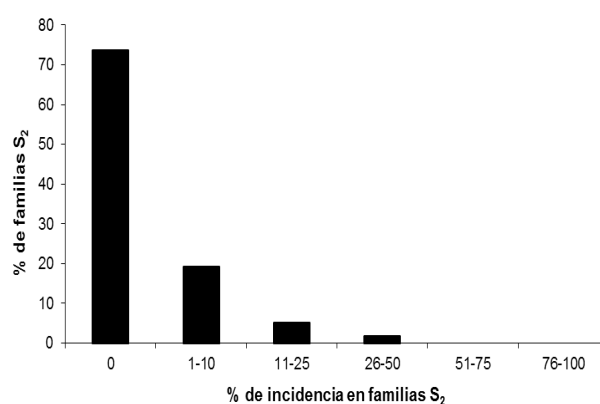


Figura 5. Distribución de la incidencia de carbón de la espiga en líneas  $C_2$ - $S_2$  de endospermo amarillo.  
Figure 5. Frequency distribution of incidence of head smut in  $C_2$ - $S_1$  lines with yellow endosperm.

Durante el desarrollo del ensayo en invernadero se registraron temperaturas promedio de 18.47 °C en el suelo y 21.61 °C en el ambiente, además de una humedad relativa promedio de 69.76%.

La respuesta de plantas de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae* ha sido evaluada con el objetivo de identificar germoplasma resistente. Para esto se utilizan diferentes métodos de inoculación de semilla al momento de la siembra. Njuguna y Odhianbo (1989) reportan incidencias de hasta 62.8% al depositar teliosporas sobre la semilla. Stromberg *et al.* (1984), mediante inoculación a la semilla con sustrato contaminado con teliosporas, obtuvieron incidencias máximas de 56% y de 35.5% en líneas e híbridos de maíz, respectivamente. En el presente estudio en el que la inoculación de semilla se realizó con una suspensión de 1% de NaCMC y  $1.7 \times 10^7$  teliosporas mL<sup>-1</sup> (Quezada *et al.*, 2013), y se obtuvieron incidencias en líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de hasta 92.3% en los materiales de endospermo blanco y de hasta 40% en las de endospermo amarillo. Mediante la inoculación de semilla se simulan las condiciones naturales de la infección asegurando que el patógeno entre en contacto con el hospedante durante el proceso de germinación de la semilla (Prom *et al.*, 2011).

Al avanzar las líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, la proporción de líneas que presentaron algún grado de incidencia disminuyó y la proporción de líneas con 0% de incidencia se incrementó de 41.1 a 79.7% y de 49.3 a 73.7%, para el caso de maíz blanco y amarillo, respectivamente. Estos resultados muestran que este método de inoculación propicia niveles de infección y selección confiables en un programa de selección de germoplasma resistente al carbón de la espiga y permite identificar líneas que difieren en la respuesta a la infección. La presencia o ausencia de soros en la mazorca o en la espiga fue usada como indicador de la resistencia o susceptibilidad en nuestro estudio. De acuerdo con Zhao *et al.* (2015),

**Cuadro 2. Respuesta de líneas C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> de endospermo blanco y amarillo a la infección por carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) bajo inoculación artificial de la semilla.**

**Table 2. Response of C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> lines with white or yellow endosperm to the infection of head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) with artificial seed inoculation.**

| Incidencia de la enfermedad (%) | Líneas de endospermo blanco (123) | Líneas de endospermo amarillo (114) |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 0                               | 98                                | 84                                  |
| 1-10                            | 21                                | 22                                  |
| 11-25                           | 2                                 | 6                                   |
| 26-50                           | 2                                 | 2                                   |
| 51-75                           | 0                                 | 0                                   |
| 76-100                          | 0                                 | 0                                   |
| Incidencia media                | 4.06                              | 3.01                                |
| Incidencia mínima               | 0                                 | 0                                   |
| Incidencia máxima               | 42.8                              | 28.5                                |
| Desviación estándar             | 14.03                             | 6.42                                |
| DMS (5%)                        | 4.15                              | 6.1                                 |
| CV (%)                          | 22.5                              | 45.46                               |
| R <sup>2</sup>                  | 0.92                              | 0.97                                |

the aim of identifying resistant germplasm. To do this, different seed inoculation methods have been used. Njuguna and Odhianbo (1989) reported incidences of up to 62.8% when placing teliospores on the seeds at planting time. Stromberg *et al.* (1984), after inoculating the seeds with substrates contaminated with teliospores, obtained maximum incidences of 56% and 35.5% in maize lines and hybrids, respectively. In this study, seed inoculation was done with a 1% NaCMC solution and  $1.7 \times 10^7$  teliospores mL<sup>-1</sup> (Quezada *et al.*, 2013), producing up to 92.3% incidences in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white endosperm and up to 40% in those with yellow endosperm. Using seed inoculation, it is possible to simulate the natural conditions of the infection, ensuring that the pathogen is in direct contact with the host during the seed germination process (Prom *et al.*, 2011).

la resistencia está determinada por la supresión de la invasión dentro de la planta y no con la supresión de la penetración del patógeno.

Además de contar con un método de inoculación eficiente, la temperatura y humedad del suelo son factores importantes en la epidemia. En nuestro estudio se encontró una excelente germinación de teliosporas e infección del hospedante a 18.47 y 19.4 °C, lo cual difiere con Matyac y Kommedahl (1985a) y Baier y Krüger (1962), quienes reportan que temperaturas entre 23 y 30 °C son ideales para la germinación de las teliosporas e infección de las plántulas. Los resultados obtenidos pueden explicarse debido a las temperaturas más bajas en el Altiplano de México, donde se presenta la enfermedad durante la germinación de las semillas y primeras etapas de desarrollo de las plántulas que es la etapa crucial para la infección o a la presencia de diferentes razas, las cuales varían en su comportamiento dependiendo de las condiciones ambientales y el genotipo de su hospedante (Pecina *et al.*, 2004). El contenido de humedad del suelo en promedio se mantuvo en 26.18 kPa, equivalentes a 0.2618 bar, resultando en una incidencia de hasta 92.3% en el primer ciclo de evaluación. Este nivel de humedad difiere a lo consignado por Matyac y Kommedahl (1985a) quienes reportan que una humedad del suelo de 1.5 bar propicia un mayor número de plantas infectadas, con incidencias de 32%.

En la mayoría de los programas de mejoramiento genético en maíz la evaluación y selección contra enfermedades se realiza en condiciones de campo. En nuestro estudio se mostró que es posible combinar el uso de invernadero (mayor presión de selección en condiciones controladas) y hacer el trabajo de mejoramiento en campo solamente con germoplasma previamente evaluado en invernadero.

Por último, las líneas seleccionadas en el presente estudio se han utilizado en la formación de variedades sintéticas con buen comportamiento

When advancing the C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines to C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, the proportion of lines with some degree of incidence decreased, and the proportion of lines with an incidence of 0% increased from 41.1 to 79.7% and from 49.3 to 73.7%, in maize with white or yellow endosperm, respectively. These results show that this method of inoculation leads to higher levels of infection and reliable selection in a program for the selection of germplasm resistant to head smut and helps in identifying lines with different response to infection. In this study, the presence or absence of smut in the ear or tassel was used as an indicator of the resistance or susceptibility. According to Zhao *et al.* (2015), resistance is determined by the suppression of the invasion of tissues inside the plant and not with the suppression of pathogen penetration.

Not only is important to rely in an efficient inoculation method, but temperature and soil humidity are also important factors in the epidemic. In this study, an excellent germination of teliospores was determined resulting in an infection at 18.47 and 19.4 °C, which differs with Matyac and Kommedahl (1985a), and Baier and Krüger (1962), who report that temperatures ranging between 23 and 30 °C are ideal for the germination of teliospores and seedling infection. In this study, the results obtained can be explained by the lower temperatures in the Central Mexican Highlands, where the disease is present at seed germination and first stages of development of the seedlings, the crucial stages for the infection, or by the presence of different genetic backgrounds with different behavior depending on the weather conditions and the genotype of the host (Pecina *et al.*, 2004). The average soil humidity remained at 26.18 kPa, equivalent to 0.2618 bar, resulting in an incidence of up to 92.3% in the first cycle of evaluation. This level of humidity is different to reports by Matyac and Kommedahl (1985a), who stated that a soil

agronómico y resistencia genética al carbón, además de ser incorporadas en programas de mejoramiento genético para resistencia al carbón de la espiga en el Estado de México y el estado de Hidalgo.

## CONCLUSIONES

El programa de selección S1-S2 recurrente probó ser eficiente en la generación y selección de líneas con diferente grado de susceptibilidad al carbón de la espiga.

La técnica de inoculación utilizada fue eficiente para discriminar germoplasma resistente del susceptible.

La selección en campo de líneas de maíz con características agronómicas deseables y evaluación de la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en invernadero, son metodologías complementarias para la generación de líneas resistentes en un programa de mejoramiento genético.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PM 0531 y PM 0542 “Desarrollo de cultivares de maíz (*Zea mays*) para el Altiplano de México con alto rendimiento y resistencia al carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*)”, financiado por la Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 176171 para el primer autor.

## LITERATURA CITADA

Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A y Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays* L.) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. Revista Mexicana de

humidity of 1.5 bar leads to a greater number of infected plants, with incidences of 32%.

In most maize genetic improvement programs, evaluations and selection against diseases are done under field conditions. This study showed that it is possible to combine the use of a greenhouse (greater selection pressure in controlled conditions) while perform breeding work in the field only with germplasm that has previously been evaluated and selected in the greenhouse.

Finally, the lines selected in this study have been used in the formation of synthetic varieties with a good agronomic behavior and resistance to head smut, as well as being incorporated into breeding programs for resistance to head smut in the states of Mexico and Hidalgo.

## CONCLUSIONS

The S1 recurrent selection program proves to be efficient in generating and selecting lines with different degrees of susceptibility to head smut.

The technique of inoculation used was efficient in the discrimination of resistant and susceptible germplasm.

The selection of maize lines in the field with desirable agronomic characters and evaluation of infection with *S. reilianum* f. sp. *zeae* in the greenhouse are complementary methodologies for the generation of resistant lines in a genetic improvement program.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the projects PM 0531 and PM 0542 “Development of maize (*Zea mays*) cultivars for the Mexican Highlands with high yield and resistance to head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*)”, financed by the General Board for Plant Health of the National Food Health, Safety and Quality

- Fitopatología. 29:39-49. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092011000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100004)
- Baggett JR and Kean D. 1989. Reduction on plant height by head smut infection in sweet corn cultivars. *HortScience* 24:497-499.
- Baggett JR and Koepsell PA. 1983. Field inoculation of sweet corn with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). *HortScience* 18:67-68. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19840032591>
- Baier W and Krüger W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. II. Field studies on the effect of soil conditions. *South African Journal of Agricultural Science*. 5:183-190. Disponible en línea: [http://hdl.handle.net/10520/AJA05858860\\_789](http://hdl.handle.net/10520/AJA05858860_789)
- Bernardo R, Bourrier M and Oliver JL. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. *Agronomie* 12: 303-306. <https://doi.org/10.1051/agro:19920403>
- Duan YZ, Li XX, Ai FZ, Yang JH and Li FM. 1992. Selection and identification on resistance resource of corn head smut of Shanxi Province. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*. 1:83-86. Disponible en línea: [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-XBNX199204019.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-XBNX199204019.htm)
- Frederiksen RA and Reyes L. 1980. The head smut program at Texas A&M. p. 367-372. In: Williams, R. J., R. A. Frederiksen, L. K. Mughogho, and G. D. Bengston (eds). *Sorghum Diseases: A World Review*. ICRISAT. Patancheru, A. P. India.
- Ghareeb H, Becker A, Iven T, Feussner I and Schirawski J. 2011. *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiology*. 156: 2037-2052. DOI: 10.1104/pp.111.179499
- Hallauer AR. 1992. Recurrent selection in maize. *Plant Breeding Reviews*. 9:115-119.
- Hallauer AR and Miranda JB. 1988. Quantitative genetics in plant breeding. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa State Univ. Ames, IO. Disponible en línea: [http://majidi.iut.ac.ir/sites/majidi.iut.ac.ir/files/files\\_course/quantitative\\_genetics\\_in\\_maize\\_breeding.pdf](http://majidi.iut.ac.ir/sites/majidi.iut.ac.ir/files/files_course/quantitative_genetics_in_maize_breeding.pdf)
- Jin QM, Li JP, Zhang XW, Wang GX, Song SY, Liu YC, and Wang LX. 2000. Establishment IPM of system of corn diseases and pest insects in the spring corn belt. *J. Maize Sci*. 8:84-88. Disponible en línea: [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-YMKX200002024.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YMKX200002024.htm)
- Krüger W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. I. Infection and control studies. *South African Journal of Agricultural Science*. 5:43-56. Disponible en línea: <http://journals.co.za/docserver/fulltext/sajags/5/1/651.pdf?expires=1501296467&id=id&acname=guest&checksum=B06F86322D5C9D77F5A385962E0632DD>
- Lübberstedt T, Xia XC, Tan G, Liu X and Melchinger AE. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reiliana* in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 99:593-598. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fsf001220051273>
- Mack HJ, Baggett JR and Koepsell PA. 1984. Effects of cultural practices on the incidence of head smut in sweet corn. *HortScience* 19:77-78. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19850004321>
- Service (SENASICA). To the National Science and Technology Council (CONACYT), for scholarship number 176171 for the main author.

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

- Martínez CA, Roux C and Dargent R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Phytopathology* 89:247-253. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.3.247>
- Martínez CA, Jauneau C, Roux C, Savy C and Dargent R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma* 213:83-92. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01280508>
- Martínez CA, Roux A, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94:505-514. <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2003.11833215>
- Martínez-Ramírez JL y Ledesma-Medrano J. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco. México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8:68-70.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75:577-581. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n05_577.PDF
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985. Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Disease*. 69:251-254. DOI: 10.1094/PD-69-251
- Montes GN y Díaz AF. 2006. Fitopatología. p. 192-213. In: *Campo Experimental Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos*. Rodríguez del Bosque, L. A. (ed). Libro Técnico No. 1, INIFAP. Río Bravo, Tamaulipas, México.
- Njuguna JGM. and Odhiambo RO. 1989. Head smut distribution, expression and genetic resistance of maize to *Sphacelotheca reiliana* in Kenya. *East African Agricultural and Forestry Journal*. 55:81-83. Disponible en línea: <http://www.kalro.org:8080/repository/bitstream/0/2082/1/KARI%20EAAF%20JULY%20-%20OCTOBER1989%20VOL%20LV%20NOS%201%20-%20202%20Split%2012.pdf>
- Pecina-Quintero V, Williams-Alanis H, Montes-García N, Rodríguez-Herrera R, Rosales-Robles E y Vidal-Martínez VA. 2004. Incidence of head smut *Sporisorium reilianum* (Kühn) Langdon and Fullerton in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] hybrids with A₁ and A₂ cytoplasm. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22:315-319. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/237037476_Incidence_of_Head_Smut_Sporisorium_reilianum_Kuhn_Langdon_and_Fullerton_in_Sorghum_Sorghum_bicolor_L_Moench_Hybrids_with_A1_and_A2_Cytoplasm

- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2003. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola 2002. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Téc. 6. CIRCE. INIFAP.
- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2004. Carbón de la espiga de maíz. Resultados de los ciclos agrícolas Pv 2002 y 2003. Foll. Informativo 1. CIRCE. INIFAP.
- Pradhanang PM and Ghimire SR. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. Trop. Agric. 73:325-328. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302866937>
- Prom LK, Perumal SR, Erattaimuthu JE, Erpelding N, Montes GN, Odvody C, Greenwald Z, Jin R, Frederiksen R and Magill CW. 2011. Virulence and molecular genotyping studies of *Sporisorium reilianum* isolates in sorghum. Plant Disease. 95:523-529. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0720>
- Quezada S.A., De León-G. C., Hernández A.M. y Nava-D. C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana Fitopatología. 31:80-90. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a1.pdf>
- Song SY, Sun XH, Guo WG and Liu JR. 2000. Identification of germplasm for resistance to head smut in maize. Agric. Sci. Jilin 25:32-33.
- Stienstra WC, Kommedahl T, Stromberg EL, Matyac CA, Windels CE and Morgan F. 1985. Suppression of Corn head smut with seed and soil treatments. Plant Disease. 69:301-302. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1985Articles/PlantDisease69n04_301.pdf
- Stromberg EL. 1981. Head smut of maize, a new disease in Minnesota. Phytopathology 71:906
- Stromberg EL, Stienstra WC, Kommedahl T, Matyac CA, Windels CE and Gadelman JL. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. Plant Disease. 68:880-884. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n10_880.pdf
- Wang ZH, Li XH, Xie CX, Li MS, Hao ZF, George MLC, Xiao MJ, Gao SR and Zhang SH. 2008. Genetic diversity in a collection of chinese maize inbred lines for resistance to head smut caused by *Sporisorium reiliana*. Maydica 53:47-54. Disponible en línea: http://www.maydica.org/articles/53_047.pdf
- White DG. 1999. Smuts. In: Compendium of corn diseases. 3rd. Ed. APS Press. Saint Paul, MN. USA. 33 p.
- Wright PJ, Fullerton RA and Koolaard JP. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 34:23-26. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.2006.9514383>
- Zhao X, Yea J, Weia L, Zhanga N, Xingc Y, Zuoa W, Chaoa Q, Tanc G, and Xua M. 2015. Inhibition of the spread of endophytic *Sporisorium reilianum* renders maize resistance to head smut. The Crop Journal. 3:87-95. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.02.001>

Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control

Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control

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

Recibido: 29 de Marzo, 2017.

Aceptado: 09 de Mayo, 2017.

Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R. 2017. Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 549-570.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-9

Primera publicación DOI: 09 de Junio, 2017.

First DOI publication: June 09, 2017.

Resumen. Las especies del género *Colletotrichum* son agentes causales de antracnosis en un amplio rango de hospedantes. De acuerdo con estudios taxonómicos, *Colletotrichum* se clasifica filogenéticamente en 9 clados; la identificación molecular de los complejos de especies se basa en distintas regiones genómicas conservadas. En México, se han reportado 46 especies de las cuales 28 se identificaron a nivel morfológico y 18 a nivel molecular. *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* son las principales especies reportadas que afectan a un mayor número de hospedantes como papaya, chile, mango, limón y aguacate, entre otros. Este rango

Abstract. *Colletotrichum* species are causal agents of anthracnose in a wide host range. According to taxonomic studies, *Colletotrichum* is phylogenetically classified into nine clades; the molecular identification of species complexes is based on different conserved genomic regions. In Mexico, 46 *Colletotrichum* species have been reported, from which 28 were identified at morphological level and 18 at molecular level. The main species reported are *C. gloeosporioides* and *C. truncatum* as they affect a great number of hosts such as papaya, chili, mango, lemon, avocado, among others. This wide range of hosts may be because these species have different infection strategies according to the host: intramural subcuticular colonization or intracellular colonization. Control strategies for *Colletotrichum* spp. include physical, chemical and biological control, among others. The objective of this review is to know the status of *Colletotrichum* species in Mexico.

Key words: Anthracnose, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, infection strategies.

amplio de hospedantes puede deberse a la habilidad del hongo de emplear diferentes estrategias de infección: colonización intramural subcuticular o colonización intracelular. Las estrategias de control en *Colletotrichum* spp. incluyen control físico, químico y biológico, entre otras. El objetivo de esta revisión consiste en describir el estado actual de las especies de *Colletotrichum* en México.

Palabras clave: Antracnosis, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, estrategias de infección.

Colletotrichum es un género de hongos fitopatógenos que ocasiona enfermedades como cánceres, pudriciones y principalmente antracnosis en diferentes hospedantes; se manifiesta en lesiones semicirculares con hundimientos en forma de anillos concéntricos (Figura 1) (Hyde *et al.*, 2009a). A nivel mundial se reporta la antracnosis en frutas, hortalizas, cereales, plantas herbáceas, maderables y ornamentales, entre otras; sobre todo en zonas templadas y tropicales (Udayanga *et al.*, 2013).

Colletotrichum incluye más de 100 especies responsables de antracnosis en casi todos los cultivos destinados a la producción de alimentos, fibras y forrajes a nivel mundial, como por ejemplo *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *C. graminicola*, *C. boninense*, entre otras (Crouch *et al.*, 2014). Debido a su importancia científica y económica, las especies de *Colletotrichum* ocuparon el octavo lugar en la clasificación mundial de patógenos de plantas (Dean *et al.*, 2012).

La antracnosis genera pérdidas importantes en pre y postcosecha ya que ocasionan una reducción en la calidad y cantidad de diversos cultivos. Las pérdidas pueden llegar hasta el 100 % dependiendo del patógeno y las condiciones climáticas (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016); por ejemplo, en el cultivo intensivo de papaya bajo manejo de fungicidas, la prevalencia de antracnosis en campo y

Colletotrichum is a genus of phytopathogen fungi that causes diseases such as cancer, rot, and particularly anthracnose to different hosts. *Colletotrichum* symptoms appear as semicircular lesions with sunken areas like concentric rings (Figure 1) (Hyde *et al.*, 2009a). Anthracnose has been reported world wide in fruit, vegetables, cereals, herbaceous plants, timber crops and ornamental plants, among other (Udayanga *et al.*, 2013).

Colletotrichum includes over 100 species responsible for anthracnose in almost all food, fiber and forage crops worldwide, including *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *C. graminicola*, *C. boninense* (Crouch *et al.*, 2014). Due to its scientific and economic importance, *Colletotrichum* species were ranked eighth in the world classification of plant pathogens (Dean *et al.*, 2012).

Anthracnose causes major pre- and postharvest losses by reducing the quality and quantity of various crops. Losses may reach up to 100 % depending on the pathogen and weather conditions (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016). For example, in intensive papaya crops under fungicide management, the prevalence of anthracnose in the field and postharvest has caused losses greater than 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2013).

The population diversity of *Colletotrichum* from previous reports is complicated because of the lack of tools to identify the species and because the traditional methods were based on morphological differences that nowadays are known to be inadequate and inaccurate (Hyde *et al.*, 2009b).

Although there is diverse information about *Colletotrichum* spp., in Mexico there are no publications describing the *Colletotrichum* species that have been studied locally nor of the hosts reported to have caused damage. Therefore, the objective of this study was to describe the current status of *Colletotrichum* in Mexico through a review of published results from taxonomy, identification, reported species, pathogenesis and control.

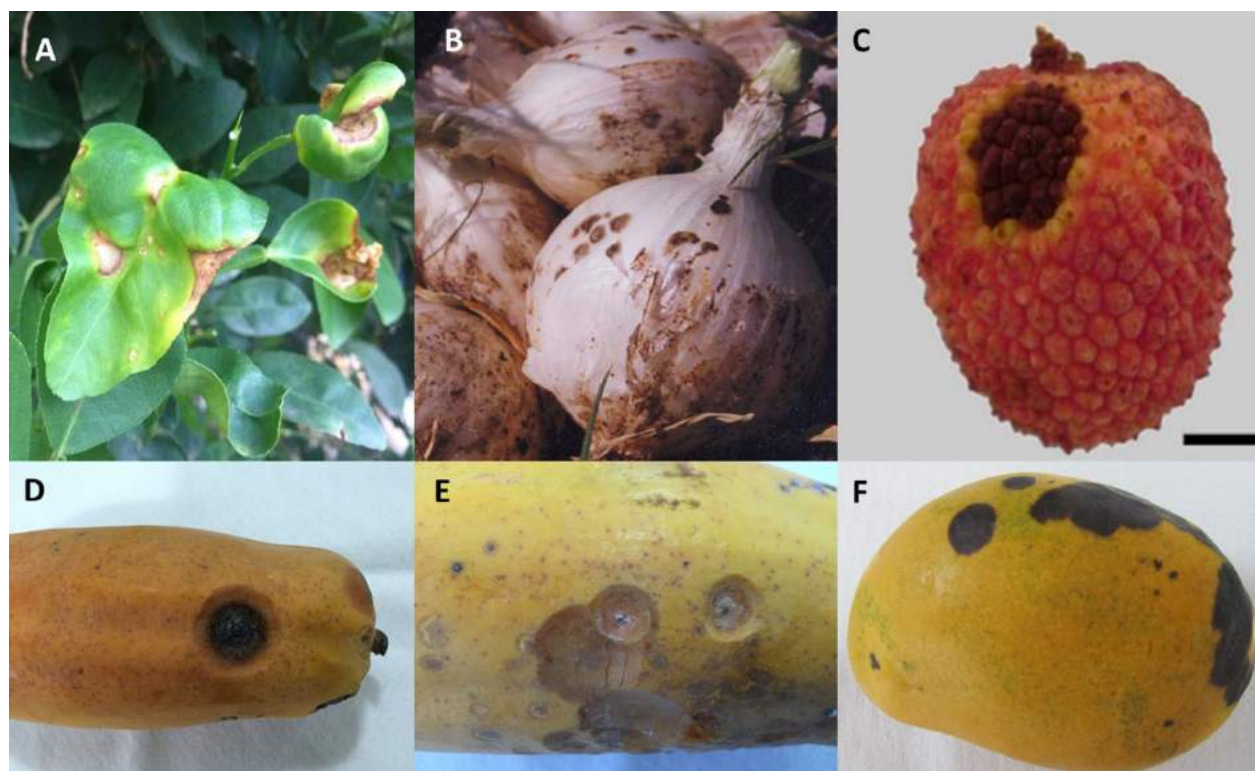


Figura 1. Síntomas de antracnosis ocasionados por *Colletotrichum* spp. A) *Colletotrichum* sp. en hojas de limón mexicano; B) *C. circinans* en cebolla (Tomado de Montes-Belmont *et al.*, 2003); C) *C. gloeosporioides* en litchi (Tomado de Martínez-Bolaños *et al.*, 2015); D) y E) *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en papaya; F) *C. gloeosporioides* en mango.
Figure 1. Anthracnose symptoms caused by *Colletotrichum* spp. A) *Colletotrichum* sp. in leaves of Mexican lemon; B) *C. circinans* in onion (Taken from Montes-Belmont *et al.*, 2003); C) *C. gloeosporioides* in lychee (Taken from Martínez-Bolaños *et al.*, 2015); D) and E) *C. truncatum* and *C. gloeosporioides* in papaya; F) *C. gloeosporioides* in mango.

en postcosecha provocado pérdidas superiores al 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2013).

La diversidad poblacional de *Colletotrichum* a partir de reportes previos es complicada por las limitaciones en cuanto a herramientas de identificación de especies ya que los métodos tradicionales se basaron en diferencias morfológicas que hoy en día se saben insuficientes e imprecisas (Hyde *et al.*, 2009b).

A pesar de que existe diversa información acerca de *Colletotrichum* spp., en México no existen publicaciones que describan a las especies de *Colletotrichum* que han sido estudiadas en el país, así

TAXONOMY

Colletotrichum includes the asexual stage (anamorph) of the *Glomerella* (teleomorph) species that belongs to Phylum Ascomycota, Hypocreomycetidae class, Glomerellales order, Glomerellaceae family (Réblová *et al.* 2011). Glomerellaceae is a monotypical family characterized by non-stromatic dark perithecia, well-developed paraphysed ostioles and abundant thin-walled paraphyses. *Glomerella* was initially considered a member of the order Phyllacorales, but some of its characteristics are clearly different

como los hospedantes donde se han reportado causando daños. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es describir la situación actual de *Colletotrichum* en México mediante una recopilación de resultados publicados respecto a taxonomía, identificación, especies reportadas, patogénesis y control.

TAXONOMÍA

Colletotrichum comprende el estado asexual (anamorfo) de *Glomerella* (teleomorfo), el cual pertenece al phylum Ascomycota, clase Hypocreomycetidae, orden Glomerellales, familia Glomerellaceae (Réblová *et al.* 2011). Glomerellaceae es una familia monotípica caracterizada por peritecios oscuros no estromáticos, ostiolos perifisados bien desarrollados, abundantes paráfisis de pared delgada. *Glomerella* inicialmente se ubicó en el orden Phyllacorales, pero algunas de sus características son claramente distintas a la de otros miembros: por ejemplo su falta de tejido estromático y sus anamorfos exclusivos de *Colletotrichum* (Zhang *et al.*, 2006).

Colletotrichum es un género confuso taxonómicamente, debido a que existe variación del nombre del género de acuerdo a su estado sexual; en el año 2012, los miembros de la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Colletotrichum* (ISTC) apoyaron el uso del término *Colletotrichum* sobre el de *Glomerella* derivado de su mayor uso en ciencias aplicadas; lo que dio la expectativa de generar menores cambios taxonómicos en las especies de ese género (Damm *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

La identidad de especies importantes de *Colletotrichum* aún requiere consideración y aunque, las técnicas moleculares y filogenéticas mejoran la precisión de los métodos morfológicos y bioquímicos tradicionales, se requiere un diagnóstico integral que brinde mayor robustez.

from those of other members; for example, the lack of stromatic tissue and anamorphs specific to *Colletotrichum* (Zhang *et al.*, 2006).

Colletotrichum is a taxonomically confusing genus because the name of the genus varies depending on its sexual state. In 2012, members of the International Subcommittee on Taxonomy of *Colletotrichum* (ISTC) supported the use of the term *Colletotrichum* over *Glomerella* because it is more widely used in applied science, and this created the expectation to make minor taxonomic changes in the species of that genus (Damm *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

Identifying important *Colletotrichum* species still requires further studies, and although the molecular and phylogenetic techniques improve the accuracy of the traditional morphological and biochemical methods, what is needed is an integrated diagnosis that is more solid.

Based on phylogenetic analysis, species complexes have been identified within the *Colletotrichum* genus which are classified into nine major clades: acutatum clade (includes 29 species) (Damm *et al.*, 2012a), boninense clade (27 species) (Damm *et al.*, 2012b), destructivum clade (13 species) (Damm *et al.*, 2014), gloeosporioides clade (22 species) (Weir *et al.*, 2012), orbiculare clade (8 species) (Damm *et al.*, 2013), graminicola clade (13 species), dematium clade (6 species), spaethianum clade (5 species) and truncatum clade (3 species) (Cannon *et al.*, 2012; Udayanga *et al.*, 2013).

IDENTIFICATION

Morphological

Traditionally, the *Colletotrichum* genus has been identified through morphological traits such as:

De acuerdo a análisis filogenéticos se han identificado complejos de especies dentro del género *Colletotrichum*, los cuales están clasificados en nueve clados principales: clado acutatum (comprende 29 especies) (Damm *et al.*, 2012a), clado boninense (27 especies) (Damm *et al.*, 2012b), clado destructivum (13 especies) (Damm *et al.*, 2014), clado gloeosporioides (22 especies) (Weir *et al.*, 2012), clado orbiculare (8 especies) (Damm *et al.*, 2013), clado graminicola (13 especies), clado dematium (6 especies), clado spaethianum (5 especies) y clado truncatum (3 especies) (Cannon *et al.*, 2012; Udayanga *et al.*, 2013).

IDENTIFICACIÓN

Morfológica

Tradicionalmente, el género *Colletotrichum* se ha identificado mediante caracteres morfológicos que incluyen: tamaño y forma de conidios, y apressorios; presencia o ausencia de setas, esclerocios, acérvulos, estado teleomorfo; así como características culturales como por ejemplo color de la colonia, textura y tasa de crecimiento (Hyde *et al.*, 2009b). *C. truncatum* presenta conidios unicelulares de tamaño 22.8 - 23.8 x 3 - 3.02 µm, hialinos, de paredes lisas, sin septos, la parte central por lo general se encuentra ligeramente curvada con paredes paralelas, que termina abruptamente en base redonda y truncada, con contenido granular (Figura 2A); en contraste, *C. gloeosporioides* presenta conidios ovoides de tamaño 13.56 - 14.24 x 4 - 4.02 µm (Figura 2B). Las colonias de *C. truncatum* son de forma circular o irregular, con margen entero, de coloración blanco a salmón o gris a negro con masas conidiales producidas en anillos concéntricos (Figura 2C) y las de *C. gloeosporioides* muestran crecimiento micelial de forma radial, con margen entero u ondulado, generalmente de coloración

conidia size and shape, and appressoria; presence or absence of setae, sclerotia, acervuli, teleomorph stage, as well as cultural characteristics, such a colony color, texture and growth rate (Hyde *et al.*, 2009b). *C. truncatum* exhibits unicellular conidia 22.8-23.8 x 3-3.02 µm in size, smooth-wall hyalines without septa; generally the central part is slightly curved, has parallel walls, and ends abruptly in a round short base with granular content. (Figure 2A). In contrast, *C. gloeosporioides* presents ovoid conidia 13.56-14.24 x 4 - 4.02 µm in size (Figure 2B). *C. truncatum* colonies are circular or irregular, with entire margin, white-to-salmon or gray-to-black coloration and conidial masses produced in concentric rings (Figure 2C); *C. gloeosporioides* colonies exhibit radial mycelial growth, with entire or undulated margin usually white in color with orange conidial masses in the middle of the colony (Figure 2D). On the other hand, *Colletotrichum* presents different morphotypes, for example, circular and with entire margin, mycelium gray in color with orange conidial masses (Figure 2E) (Torres-Calzada *et al.*, 2012).

According to Barnett and Hunter (1998), *Colletotrichum* is a genus characterized by exhibiting waxy, subepidermal and separate acervuli shaped like disks or cushions that emerge from the host plant; typically they contain setae or black spines at the edges or among conidiophores; conidiophores are simple and elongated while conidia are hyaline and ovoid or oblong. Not all the *Colletotrichum* species have ovoid or oblong conidia, since there are species that produce curved conidia, such as *C. dematium* and *C. lineola* (Damm *et al.*, 2009).

Crouch *et al.* (2009a) consider that conidia shape and size, just as in appressoria, are of little taxonomic use to characterize cereal grain species. Species with similar morphological characteristics may be highly variable at physiological and pathogenic levels due to environment or incubation

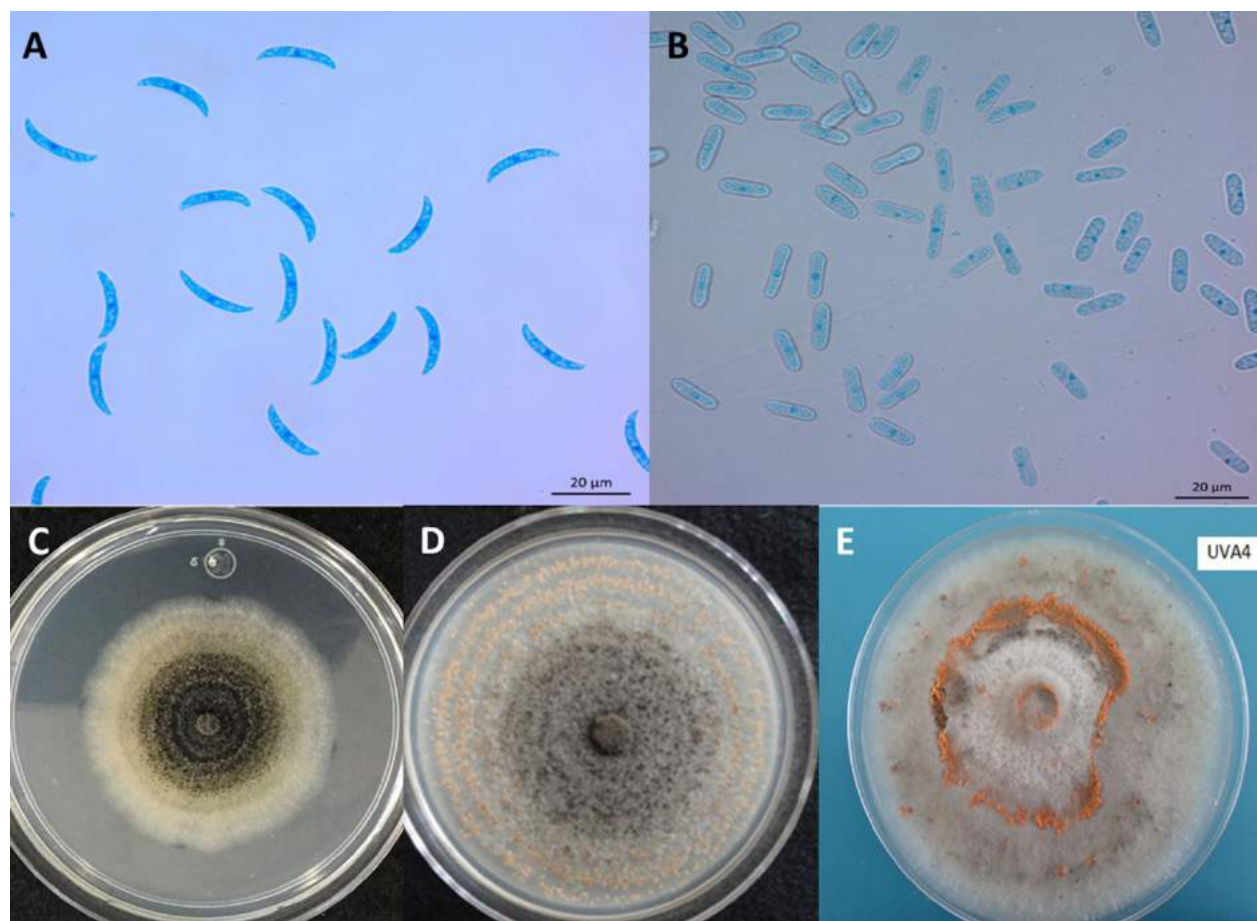


Figura 2. Características morfológicas de las principales especies de *Colletotrichum* en México. A) Conidios asexuales de *C. truncatum*; B) Conidios asexuales de *C. gloeosporioides*; C) Morfología colonial de *C. truncatum* en PDA; D) Morfología colonial de *C. gloeosporioides* en PDA; E) Morfología colonial de *Colletotrichum* sp. aislada de naranja.
Figure 2. Morphological characteristics of the main *Colletotrichum* species in Mexico. A) *C. truncatum* asexual conidia; B) *C. gloeosporioides* asexual conidia; C) Colony morphology of *C. truncatum* in PDA; D) Colony morphology of *C. gloeosporioides* in PDA; E) Colony morphology of *Colletotrichum* sp. isolated from orange.

blanco con masas conidiales de color anaranjado en el centro de la colonia (Figura 2D). Por otra parte, *Colletotrichum* presenta distintos morfotipos, como por ejemplo margen circular, entero, coloración de micelio gris, con masas conidiales anaranjadas (Figura 2E) (Torres-Calzada *et al.*, 2012).

De acuerdo con Barnett y Hunter (1998), *Colletotrichum* es un género que se caracteriza por presentar acérvulos separados en forma de disco o cojín, cerosos, subepidermales que emergen de la planta hospedante, típicamente contienen setas o

conditions, among other factors. Furthermore, their morphological characteristics are not enough for diagnosis because of the great variation on the phenotype morphology among species under different environment conditions (Cai *et al.*, 2009). To address such deficiencies in traditional identification, the combined use of molecular characterization along with the traditional diagnosis are currently considered an appropriate technique to study complexes in *Colletotrichum* species (Hyde *et al.*, 2009b).

espinas negras en los bordes o entre los conidióforos; los conidióforos son simples y elongados; los conidios son hialinos, ovoides u oblongos. No todas las especies de *Colletotrichum* tienen conidios ovoides u oblongos, ya que existen especies con conidios curvados como por ejemplo *C. dematium* y *C. lineola* (Damm *et al.*, 2009).

Crouch *et al.* (2009a) consideran que la forma y tamaño de los conidios, al igual que en apresorios, son de poca utilidad taxonómica para caracterizar especies graminícolas. Las especies con características morfológicas similares pueden tener una considerable variación a nivel fisiológico y patogénico debido a las condiciones ambientales o de incubación, entre otras. Así mismo, las características morfológicas no son suficientes para un diagnóstico, puesto que existe gran variación en morfología del fenotipo entre especies bajo diferentes condiciones ambientales (Cai *et al.*, 2009). Para superar las deficiencias de la identificación tradicional, en la actualidad, el uso combinado de caracterización molecular en conjunto con el diagnóstico tradicional constituyen una técnica adecuada para el estudio de complejos en especies de *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009b).

Molecular

Debido a las limitaciones de la identificación tradicional, el análisis de ácidos nucleicos se considera confiable para identificar especies de *Colletotrichum*; sin embargo, un inconveniente importante de la dependencia de una pequeña porción del genoma para comprender las relaciones filogenéticas entre cepas de *Colletotrichum* es el riesgo de crear árboles filogenéticos de genes en lugar de árboles filogenéticos de especies; por lo tanto, se ha empleado la filogenética de múltiples genes para caracterizar sistemáticamente relaciones entre especies de *Colletotrichum*, lo cual sirve como base

Molecular

Due to the limitations of the traditional identification approaches, nucleic acid analysis is considered a reliable technique for identifying *Colletotrichum* species. However, a very important disadvantage of depending on a small portion of the genome to understand the phylogenetic relationships between isolates of *Colletotrichum* is the risk of creating phylogenetic trees of genes instead of phylogenetic trees of species; therefore, phylogenetics of multiple genes has been used to systematically characterize the relationships among *Colletotrichum* species, which serves as a base for identification in a complex of species (Cai *et al.*, 2009).

Currently, conserved gene regions or genetic barcodes are used to identify fungal species. The most used region is the internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA (Schoch *et al.*, 2012). As for *Colletotrichum* spp., to study the *Colletotrichum* species closely related, in addition to the ITS region, other regions are also used such as: partial actin (ACT), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL), glutamine synthetase (GS), chitin synthase (CHS1), histamine (HIS3), lyase (APN2), *apn2* intergenic region and MATI-2-1 (ApMat), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Cai *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2014). Phylogenetics of multiple genes has been successfully applied to determine relations among species with curved conidia in herbal hosts. An example of this are the new taxon of *C. hanau*, *C. nicholsonii*, *C. paspali* species, among others (Crouch *et al.*, 2009a).

Although phylogenetics of multiple genes is an accurate and reliable method to diagnose *Colletotrichum* spp., it is not very efficient or economically viable. It is currently impractical to use phylogenetics of multiple genes for all

para la identificación en un complejo de especies (Cai *et al.*, 2009).

En la actualidad se utilizan regiones génicas conservadas o códigos de barras genéticos para la identificación de especies fúngicas. La región más utilizada es el espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal nuclear (Schoch *et al.*, 2012). En *Colletotrichum* spp., además de la región ITS, para estudiar especies de *Colletotrichum* estrechamente relacionadas, se utilizan también regiones como: actina parcial (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), glutamina sintetasa (GS), quitina sintasa (CHS1), histamina (HIS3), liasa (APN2), región intergénica de *apn2* y *MATI-2-1* (ApMat), y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Cai *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2014). La filogenie de múltiples genes se ha aplicado con éxito para resolver relaciones entre especies con conidios curvados en hospedantes herbáceos, ejemplo de ello son los nuevos taxos de especies *C. hanau*, *C. nicholsonii*, *C. paspali*, entre otras (Crouch *et al.*, 2009a).

Aunque la filogenia de genes múltiples es una forma precisa y confiable para el diagnóstico de *Colletotrichum* spp., no es tan eficiente ni económicamente viable; actualmente es poco práctico utilizar la filogenética múltiple para todas las especies, por lo que distintos grupos de investigación utilizan diferentes regiones génicas. La región ITS es la más ampliamente secuenciada; sin embargo, las secuencias de esta región no son totalmente confiables en cuanto a la discriminación entre especies de *Colletotrichum* (Cai *et al.*, 2009), ya que por ejemplo Crouch *et al.* (2009b) reportaron una tasa alta de errores de identificación (86 %) basada en la comparación de secuencias dentro del complejo de especies *C. graminicola*. Por otro lado, las secuencias ITS depositadas en bases de datos públicas (Genbank) pueden causar confusión puesto que se introducen secuencias con nombres erróneos y pueden comprender especies crípticas.

the species, and this is the reason why different research groups use different gene regions. The ITS region continues to be the most sequenced, but its sequences are not completely reliable for discriminating among *Colletotrichum* species (Cai *et al.*, 2009), given that, for example, Crouch *et al.* (2009b) reported a high rate of identification errors (86 %) based on sequences compared within the complex of *C. graminicola* species. On the other hand, the ITS sequences deposited in public databases (Genbank) can cause confusion because sequences are introduced into them under the wrong names or they may include cryptic species.

Therefore, the study of the genotype includes sequencing to combine phylogenetic traits, while the phenotypic study should be expanded to a polyphasic sense to include morphology, physiology, pathogenicity, infection process, cultural characteristics and secondary metabolites (Cai *et al.*, 2009). Thus, both studies about *Colletotrichum* must be used to perform a reliable and effective diagnosis.

***Colletotrichum* species DESCRIBED IN MEXICO**

In Mexico, several *Colletotrichum* species have been reported as anthracnose causal agents in different hosts. Eighty two *Colletotrichum* species have been reported in monocotyledon plants such as corn (*Zea mays*) (Álvarez, 1976), henequen (*Agave fourcroydes*) (Quijano-Ramayo *et al.*, 2002), sorghum (*Sorghum vulgare*) (Álvarez, 1976), as well as in dicotyledons such as banana (*Musa* spp.) (Marin *et al.*, 1996), strawberry (*Fragaria chiloensis* var. *Ananassa*) (Fraire-Cordero *et al.*, 2003) and rose (*Rosa* spp.) (Álvarez, 1976), among other crops.

Based on morphological characterization, 28 species have been described, 23 of which

Por lo tanto, el estudio del genotipo incluye secuenciación para realizar una combinación de caracteres filogenéticos, mientras que el estudio fenotípico debe ampliarse en un sentido polifásico que incluya morfología, fisiología, patogenicidad, proceso de infección, características culturales y metabolitos secundarios (Cai *et al.*, 2009). Así, la identificación de *Colletotrichum* debe utilizar ambos estudios para establecer un diagnóstico confiable y eficaz.

ESPECIES DE *Colletotrichum* DESCRITAS EN MÉXICO

Diversas especies de *Colletotrichum* han sido reportadas como agentes causales de antracnosis en distintos hospedantes en México. Se han reportado 82 especies de *Colletotrichum* en plantas monocotiledóneas como maíz (*Zea mays*) (Álvarez, 1976), henequén (*Agave fourcroydes*) (Quijano-Ramayo *et al.*, 2002), sorgo (*Sorghum vulgare*) (Álvarez, 1976), y dicotiledóneas como plátano (*Musa* spp.) (Marin *et al.*, 1996), fresa (*Fragaria chiloensis* var. *Ananassa*) (Fraire-Cordero *et al.*, 2003) y rosál (*Rosa* spp.) (Álvarez, 1976), entre otros.

Veintiocho especies se han descrito con base en la caracterización morfológica, de las cuales, 23 son anamórficas y cinco son teleomórficas (Cuadro 1). *C. gloeosporioides* es la especie más reportada de acuerdo al número de hospedantes. Las características morfológicas de *C. gloeosporioides* pueden variar incluso en el mismo hospedante; un claro ejemplo es el hallazgo de Torres-Calzada *et al.* (2013), quienes identificaron seis distintos morfotipos de *C. gloeosporioides* en papaya, éstos presentaron características culturales tales como crecimiento micelial de forma circular con margen entero u ondulado, de coloración blanca con masas conidiales de color naranja en el centro de la

are anamorphic and 5 teleomorphic (Table 1). *C. gloeosporioides* is the most reported species according to the number of hosts. *C. gloeosporioides* morphological characteristics may vary even in the same host. A clear example of this are the results reported by Torres-Calzada *et al.* (2013), who identified six different morphotypes of *C. gloeosporioides* in papaya. The morphotypes presented cultural characteristics such as circular mycelial growth with entire or undulate margin, white in color with orange conidial masses in the middle or distributed in concentric rings along the colony. Some of them developed olive-green, dark gray-to dark coloration with conidia 13.56 - 14.24 x 4 - 4.02 μm in average size.

Based on molecular characterization, 18 species have been reported: 15 species in anamorph stage and three in teleomorph stage (Table 2). An integral identification was made (morphological and molecular) in most of the species; the latter was made based on analysis of the internal transcribed spacer (ITS). Although this genome region is not completely reliable, it is the most widely used because it includes a conserved organization in the genome of all eukaryotes (18S, 5.8S and 28S), it is found in repeated units and has a great number of copies, which facilitates its amplification and makes it useful to design primers. On the other hand, these conserved regions are separated by divergent, highly variable and polymorphic in length sequences that provide information and represent a genomic fingerprinting for each species (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004).

Currently, identification at molecular level based on a single conserved region is not enough. Two or more regions are generally used. For example, for *C. godetiae* and *C. karstii* species the ITS and GADPH regions were used (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015; Velázquez-del Valle *et al.*, 2016), and for *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*,

**Cuadro 1. Especies de *Colletotrichum* reportadas en México con base en caracterización morfológica.
Table 1. *Colletotrichum* species reported in Mexico based on morphological characterization.**

| Especie | Hospedante | Referencia |
|---------------------------|---|--|
| <i>C. acutatum</i> | <i>Citrus aurantifolia</i> | Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>C. agaves</i> | <i>Agave atrovirens</i> , <i>Agave sisalana</i> , <i>Agave tequilana</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. cerei</i> | <i>Cereus</i> spp. | Álvarez, 1976 |
| <i>C. circinans</i> | <i>Allium cepa</i> | Montes-Belmont <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>C. coccodes</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Solanum tuberosum</i> | Álvarez, 1976; Lira-Saldívar <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>C. coffeanum</i> | <i>Cocothrinax readii</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. gigasporum</i> | <i>Coffea arabica</i> | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. gloeosporioides</i> | <i>Anacardium occidentale</i> , <i>Annona muricata</i> , <i>Annona</i> spp., <i>Annona cherimola</i> , <i>Bactris gasipae</i> , <i>Bixa Orellana</i> , <i>Byrsonima crassifolia</i> , <i>Carica papaya</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Chamaedorea elegans</i> , <i>Chamaedorea tepejilote</i> , <i>Citrullus vulgaris</i> , <i>Citrus aurantifolia</i> , <i>Citrus limetta</i> , <i>Citrus limón</i> , <i>Citrus maxima</i> , <i>Citrus nobilis</i> , <i>Citrus reticulata</i> , <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus</i> spp., <i>Coffea arabica</i> , <i>Cordia alliodora</i> , <i>Dalbergia retusa</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> , <i>Euphorbia pulcherrima</i> , <i>Ficus carica</i> , <i>Ficus</i> spp., <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Litchi chinensis</i> , <i>Malus</i> spp., <i>Mangifera indica</i> , <i>Persea americana</i> , <i>Phoenix dactylifera</i> , <i>Phoradendron falcifer</i> , <i>Pouteria campechiana</i> , <i>Psidium guajava</i> , <i>Psidium</i> spp., <i>Pyrus communis</i> | Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2012; Álvarez, 1976; Nava-Díaz <i>et al.</i> , 2000; Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2015; Casarrubias-Carrillo <i>et al.</i> , 2003; Zavala-León <i>et al.</i> , 2005; Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2013; Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015; Martínez-Bolaños <i>et al.</i> , 2015; Benítez-Camilo <i>et al.</i> , 2003; Macedo <i>et al.</i> , 2012; Álvarez, 1976; Fucikovskyy y Luna, 1987; Gutiérrez-Alonso <i>et al.</i> , 2002; Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. graminicola</i> | <i>Avena sativa</i> , <i>Sorghum halepense</i> , <i>Sorghum</i> spp., <i>Triticum aestivum</i> | Leyva-Mir <i>et al.</i> , 2004; Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>C. gossypii</i> | <i>Gossypium hirsutum</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. karstii</i> | <i>Coffea arabica</i> | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. lindemuthianum</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Álvarez, 1976; Groenewold-Labrada <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez-Guerra <i>et al.</i> , 2003; Sánchez-García <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>C. luxificum</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. lycopersici</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. musae</i> | <i>Musa sapientum</i> , <i>Musa paradisiaca</i> | Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2015; Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>C. nigrum</i> | <i>Capsicum annuum</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. orbiculare</i> | <i>Citrullus vulgaris</i> , <i>Cucumis melo</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita pepo</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. siamense</i> | <i>Coffea arabica</i> | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. theobromicola</i> | <i>Coffea arabica</i> | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. trichellum</i> | <i>Agave</i> spp. | Álvarez, 1976 |
| <i>C. trifolii</i> | <i>Medicago sativa</i> , <i>Trifolium pratense</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>C. truncatum</i> | <i>Capsicum annuum</i> , <i>Carica papaya</i> | Álvarez, 1976; Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>C. viciae</i> | <i>Vicia fabae</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>G. cingulata</i> | <i>Agave atrovirens</i> , <i>Capsicum</i> spp., <i>Carica papaya</i> , <i>Cydonia oblonga</i> , <i>Malus</i> spp., <i>Mangifera indica</i> , <i>Persea schiedeana</i> , <i>Pimienta dioica</i> , <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus</i> spp., <i>Psidium guajava</i> , <i>Pyrus communis</i> , <i>Pyrus malus</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Vanilla planifolia</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>G. gossypii</i> | <i>Gossypium hirsutum</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>G. rufomaculans</i> | <i>Pyrus malus</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>Glomerella</i> sp. | <i>Agave wislizeni</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Persea americana</i> | Álvarez, 1976 |
| <i>G. tucumanensis</i> | <i>Saccharum officinarum</i> | Álvarez, 1976 |

colonia o distribuidas en anillos concéntricos a lo largo de la colonia. Algunos morfotipos mostraron coloración oliva, gris oscuro a negro, con conidios de tamaño promedio de 13.56 - 14.24 x 4 - 4.02 μm .

Se han reportado 18 especies con base en caracterización molecular: 15 especies en estado anamorfo y tres en estado teleomorfo (Cuadro 2). En la mayoría de las especies, se realizó una identificación integral (morfológica y molecular), esta última se realizó con base en análisis de la región

C. siamense and *C. theobromicola* species, the regions: ACT, CAL, GAPDH, TUB2 and ITS (Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017).

The reported species with a greater number of hosts are *C. truncatum* (6 hosts) and *C. gloeosporioides* (5 hosts), according to preliminary identification using the ITS region (primers ITS1-ITS4) and then using CcapF-CcapR and CgInt-ITS4, respectively (Torres-Calzada *et al.*, 2011b; Tapia-Tussell *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Especies de *Colletotrichum* reportadas en México con base en caracterización molecular.
Table 2. *Colletotrichum* species reported in Mexico based on molecular characterization.

| Especie | Hospedante | Núm. acceso NCBI | Referencia |
|---------------------------|------------------------------|------------------|---|
| <i>C. acutatum</i> | <i>Leucaena</i> spp. | DQ286130 | Farr <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>C. agaves</i> | <i>Agave</i> spp. | DQ286221 | Farr <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>C. boninense</i> | <i>Persea americana</i> | EU294266 | Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011 |
| <i>C. dematium</i> | <i>Liriope</i> sp. | DQ286154 | Farr <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>C. fragarie</i> | <i>Annona cherimola</i> | AY605089 | Villanueva-Arce <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>C. gigasporum</i> | <i>Coffea arabica</i> | KT122924 | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. godetiae</i> | <i>Persea americana</i> | KM873226 | Hernández-Lauzardo <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>C. gloeosporioides</i> | <i>Annona cherimola</i> | AY841132 | Villanueva-Arce <i>et al.</i> , 2008
Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2011b |
| | <i>Coffea arabica</i> | KT122923 | |
| | <i>Carica papaya</i> | HM562710 | |
| | <i>Mangifera indica</i> | HM562712 | |
| <i>C. karstii</i> | <i>Persea americana</i> | KP729610 | Velázquez-del Valle <i>et al.</i> , 2016 |
| | <i>Coffea arabica</i> | KT122910 | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. liriope</i> | <i>Liriope muscari</i> | GU227804 | Damm <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>C. magnum</i> | <i>Carica papaya</i> | KT949404 | Tapia-Tussell <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>C. orbiculare</i> | <i>Annona cherimola</i> | AY841133 | Villanueva-Arce <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>C. siamense</i> | <i>Coffea arabica</i> | KT122936 | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>C. theobromicola</i> | <i>Coffea arabica</i> | KT122919 | Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 |
| | <i>Hibiscus sabdariffa</i> | KM519187 | Ortega-Acosta <i>et al.</i> , 2015
Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2011a
Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2011b |
| | <i>Jatropha curcas</i> | HM450126 | |
| | <i>Tithonia rotundifolia</i> | HM450127 | |
| | <i>Capsicum annuum</i> | HM562706 | |
| | <i>Citrus limonium</i> | HM562705 | |
| <i>Carica papaya</i> | HM562709 | | |
| <i>G. acutata</i> | <i>Persea americana</i> | EF221832 | Ávila-Quezada <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>G. cingulata</i> | <i>Hibiscus sabdariffa</i> | KM519191 | Ortega-Acosta <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>G. lindemuthiana</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> | AY724682 | Rodríguez-Guerra <i>et al.</i> , 2005 |

espaciadora interna transcrita (ITS); a pesar de que esta región del genoma no es totalmente confiable, es la más ampliamente utilizada debido a que esta región tiene una organización conservada en el genoma de todos los eucariotes (18S, 5.8S y 28S), se encuentra en unidades repetidas y tiene un gran número de copias, lo que facilita su amplificación; y hace que estas regiones sean útiles para el diseño de iniciadores. Por otro lado, estas regiones conservadas están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud, que son muy informativas y representan una huella genómica para cada especie (Rodríguez-Tovaret *et al.*, 2004).

En la actualidad, la identificación a nivel molecular con base en una sola región conservada es insuficiente. Generalmente se utilizan dos o más regiones; por ejemplo, para las especies *C. godetiae* y *C. karstii* se utilizaron las regiones ITS y GADPH (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015; Velázquez-del Valle *et al.*, 2016) y para las especies *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense* y *C. theobrominicola* las regiones: ACT, CAL, GAPDH, TUB2 e ITS (Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017).

Las especies reportadas con mayor número de hospedantes son *C. truncatum* (6 hospedantes) y *C. gloeosporioides* (5 hospedantes) basado en la identificación inicial con la región ITS (iniciadores ITS1-ITS4) y posterior uso de CcapF-CcapR y CgInt-ITS4, respectivamente (Torres-Calzada *et al.*, 2011b; Tapia-Tussell *et al.*, 2008).

PROCESO DE INFECCIÓN

Durante el proceso de patogenicidad; en especies de *Colletotrichum* se desarrollan eventos progresivos como la adhesión al hospedante, germinación (incluye la formación de tubos germinativos),

INFECTION PROCESS

In *Colletotrichum* species, progressive events take place during the pathogenicity process, including adherence to the host, germination (including formation of germ tubes), penetration (formation of melanized appressoria) and nutrition (colonization through intracellular hyphae and secondary infection hyphae). Today, we know the processes involved in differentiating the infectious structures of *Colletotrichum* spp., as well as the means of plant-pathogen interaction (Cannon *et al.*, 2012).

The *Colletotrichum* species use two main infection strategies: hemibiotrophic intracellular and intramural subcuticular colonization. The preliminary infection stage is very similar in both: the conidium adheres, germinates on the surface of the plant, produces the germ tube, and then produces a melanized appressorium that directly penetrates the cuticle. However, the colonization process is different in both strategies (Perfect *et al.*, 1999).

During the hemibiotrophic intracellular colonization, when penetrating the epidermic cells of the host, hyphae increases in size and form infection vesicles and a wide primary hypha around of which the plasmatic membrane invaginates. The infection vesicle and the primary hypha are surrounded by a interfacial matrix that keeps the host protoplast alive during that interaction stage. Then, the primary hypha progressively colonizes new epidermic and mesophile cells; primary hyphae produce thin necrotic secondary hyphae that quickly expand and degrade the cell walls through enzymes and cause necrotic lesions (Perfect *et al.*, 1999).

Conversely, during the intramural subcuticular strategy, after penetrating, the pathogen develops under the cuticle and creates an intramural hyphae

penetración (formación de apresorios melanizados) y nutrición (colonización mediante hifas intracelulares e hifas secundarias de infección). En la actualidad se conocen los procesos involucrados en la diferenciación de las estructuras de infección de *Colletotrichum* spp. así como los medios de interacción planta-patógeno (Cannon *et al.*, 2012).

Las especies de *Colletotrichum* utilizan dos estrategias principales de infección: colonización hemibiotrófica intracelular o colonización intramural subcuticular. El estado inicial de infección es muy similar en ambas: el conidio se adhiere, germina sobre la superficie de la planta, produce el tubo germinativo y luego forma el apresorio melanizado con el cual penetra directamente la cutícula; sin embargo, el proceso de colonización es diferente en ambas estrategias (Perfect *et al.*, 1999).

Durante la colonización hemibiotrófica intracelular, al penetrar las células epidérmicas del hospedante, las hifas aumentan de tamaño, formando vesículas de infección y una hifa primaria amplia, alrededor de la cual se invagina la membrana plasmática. La vesícula de infección y la hifa primaria están rodeadas por una matriz interfacial, por lo que el protoplasto del hospedante se mantiene vivo durante esta etapa de la interacción; posteriormente, la hifa primaria coloniza progresivamente nuevas células epidérmicas y mesófilas, a partir de las hifas primarias se forman hifas necrotóficas secundarias delgadas, las cuales se expanden rápidamente y degradan las paredes celulares mediante enzimas, lo que ocasionan lesiones necróticas (Perfect *et al.*, 1999).

En contraste, durante la estrategia de infección intramural subcuticular, después de la penetración, el patógeno se desarrolla debajo de la cutícula formando una red de hifas intramurales. Durante las etapas posteriores de infección, las hifas inter e intracelulares penetran células epidérmicas y mesófilas, lo que ocasiona la muerte del hospedante (Perfect *et al.*, 1999).

network. During the following infection stages, inter- and intracellular hyphae penetrate the epidermic and mesophile cells and cause the host to die (Perfect *et al.*, 1999).

In Mexico, few studies about the infectious process of *Colletotrichum* in its interaction with its hosts have been conducted, and they have reported only that *Colletotrichum* species use a subcuticular intramural strategy and that the period during which the infection occurs varies depending on the host. Those studies, at a histological level, need to be complemented by gene expression studies focused on pathogenicity-related genes (Figure 3). Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) studied the infectious process of *C. gloeosporioides* in its interaction with papaya. Conidia germination and direct penetration took place between 48 and 72 h after inoculation (hai). Colonization through intercellular hyphae occurred between 90 and 120 hai. Eight days after inoculation, cells collapsed and separated, the cuticle broke and acervuli and conidia developed; as a result, the sunken lesions typical of anthracnose were formed. This indicated that in its interaction with papaya, *C. gloeosporioides* uses a subcuticular intramural strategy.

On the other hand, Villanueva-Arce *et al.* (2006) studied the pathogenesis of *C. fragariae* in its interaction with chirimoya. Conidia germinated on the epidermis and trichomes of unripe fruit, penetration was achieved directly through trichomes and epidermal cells through appressoria at 24 hai. The pathogen colonization was inter and intracellular without visible biotrophic stage; after necrosis, subcuticular acervuli developed, and the life cycle of *C. fragariae* ended at 72 hai. This indicates that infection is produced through an intramural subcuticular strategy.

Rodríguez-López *et al.* (2013) studied the infection process of *C. gloeosporioides* in its interaction with avocado. The infection strategy used consisted of intramural subcuticular

En México, los estudios del proceso de infección de *Colletotrichum* en su interacción con sus hospedantes son escasos y solo han reportado que las especies de *Colletotrichum* utilizan la estrategia intramural subcuticular y que el periodo en que ocurre la infección es distinto de acuerdo al hospedante. Estos estudios, a nivel histológico, es necesario complementarlos con estudios de expresión génica que se enfoquen en los genes relacionados a patogenicidad (Figura 3). Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) estudiaron el proceso de infección de *C. gloeosporioides* en su interacción con frutos de papaya. La germinación de conidios y penetración directa ocurrió entre las 48 y 72 h después de inoculación (hdi). La colonización mediante hifas intercelulares ocurrió entre las 90 y 120 hdi. Ocho

colonization. No direct penetration was observed through appressoria. However, they observed a mucilaginous layer associated with the germ tubes; the colonization was intra- and intercellular, and the production of acervuli started 12 after inoculation.

Rojo-Báez *et al.* (2016) studied the infection process of *C. truncatum* in its interaction with leaves of papaya and of pea. In both hosts, the penetration was directly achieved through appressoria at 20 hai (Figure 4A-B). In papaya, the colonization was inter- and intracellular (Figure 4C-D). In contrast, in pea, the colonization was intracellular; primary infection hyphae were observed at 36 hai, and secondary hyphae during the necrotrophic stage at 72 hai. Acervuli were observed in both hosts at 96 hai (Figure 4E). *C. truncatum* acted as an

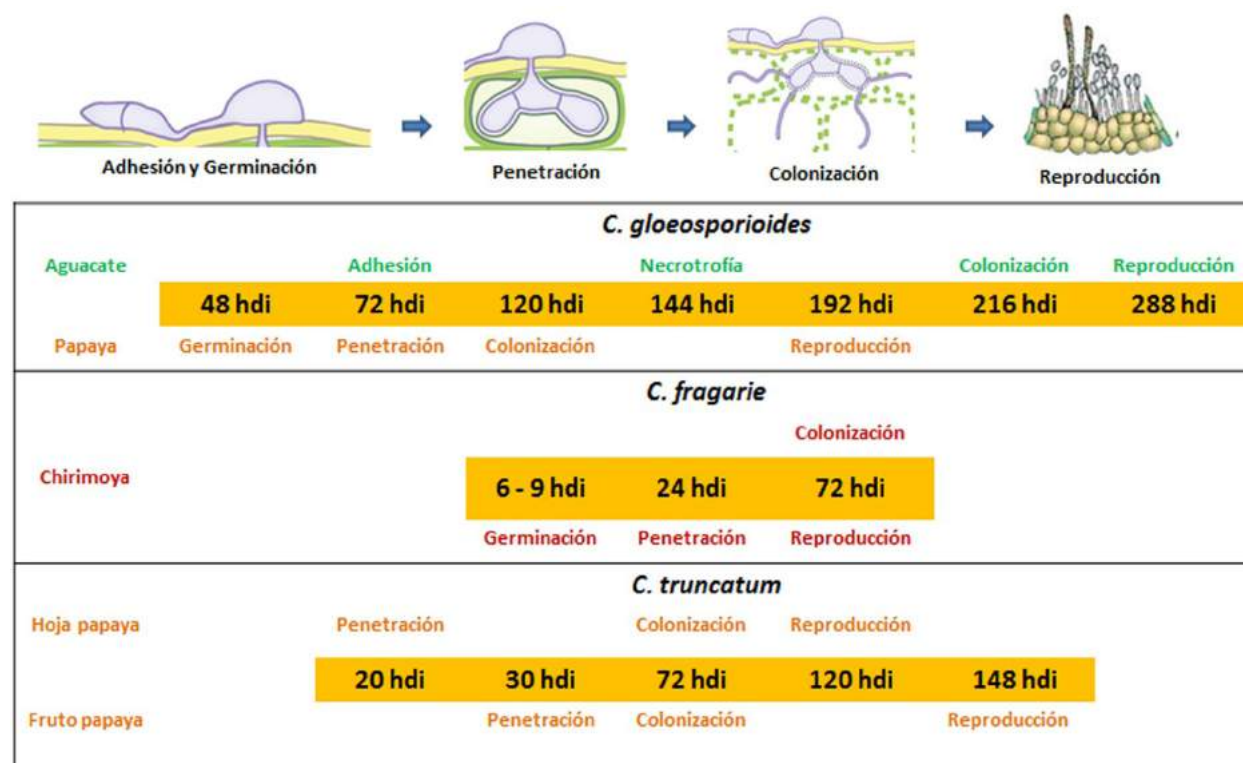


Figura 3. Etapas del proceso de infección de *Colletotrichum* spp. reportadas en México.
Figure 3. Stages of *Colletotrichum* spp. infection process reported in Mexico.

días después de la inoculación ocurrió el colapso y la separación celular, así como el rompimiento de cutícula y formación de acérvulos y conidios, dando lugar a la formación de lesiones hundidas típicas de antracnosis, por lo que *C. gloeosporioides* en su interacción con papaya desarrolla una estrategia intramural subcuticular.

Por otro lado, Villanueva-Arce *et al.* (2006) estudiaron la patogénesis de *C. fragariae* en su interacción con frutos de chirimoya. Los conidios germinaron sobre la epidermis y tricomas de frutos inmaduros, la penetración fue directa a través de tricomas y células epidermales por medio de apresorios a las 24 hdi. La colonización del patógeno fue inter e intracelular sin etapa biótrofa visible, después de la necrosis, se formaron acérvulos subcuticulares, completando el ciclo de vida de *C. fragariae* a las 72 hdi, por lo que la estrategia de infección fue intramural subcuticular.

Por otra parte, Rodríguez-López *et al.* (2013) estudiaron el proceso de infección de *C. gloeosporioides* en su interacción con frutos de aguacate. La estrategia de infección fue colonización subcuticular intramural. No se detectó penetración directa por medio de apresorios; no obstante, se observó una capa mucilaginoso asociada a los tubos germinativos, la colonización fue intra e intercelularmente y la producción de acérvulos inició a partir de los doce días después de inoculación.

Rojo-Báez *et al.* (2016) estudiaron el proceso de infección de *C. truncatum* en su interacción con hojas de papaya y de chícharo. En ambos hospedantes, la penetración ocurrió de manera directa por medio de apresorios a las 20 hdi (Figura 4A-B). En papaya, la colonización fue inter e intracelular (Figura 4C-D); en contraste, en chícharo la colonización fue intracelular, se observaron hifas primarias de infección a las 36 hdi y durante el estado necrótrofo se observaron hifas secundarias a las 72 hdi. En ambos hospedantes se observaron acérvulos a las 96 hdi (Figura 4E). *C. truncatum* se comportó

intramural subcuticular pathogen in papaya and as intracellular hemibiotroph in pea, which confirms that the infection strategy depends on the host.

Rojo-Báez *et al.* (2017) studied the infection process of *C. truncatum* in its interaction with papaya. Direct penetration through appressoria took place at 30 hai, intramural hyphae grew on the cellular walls of the epidermis between 30-48 hai, the necrotrophic colonization started at 72 hai, parenchyma cells were extensively degraded and the cuticle was broken through acervuli between 96-148 hai. Microscopic observation in papaya fruit showed that *C. truncatum* uses the subcuticular intramural infection strategy.

CONTROL

Controlling diseases caused by *Colletotrichum/ Glomerella* mainly depends on cultural practices such as using disease-free seed, crop rotation, resistant crop varieties, remove dead branches and infected fruit; physical treatment (for example, hydrothermal treatment, ozone and modified atmospheres for fruit); chemical (fungicides) and biological control (extracts of plants, antagonistic microorganisms) (Phoulivong, 2011; Landero-Valenzuela *et al.*, 2016).

As for chemical control, benzimidazole and strobilurin fungicides (that inhibit nuclear division and mitochondrial respiration, respectively) are widely used in the field. These fungicides are listed in the sanitary registry of plaguicides of the Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Torres-Calzada *et al.*, 2015; COFEPRIS, 2017); azoxystrobin, clorotalonil, mancozeb and tiabendazole fungicides are also used for controlling anthracnose in papaya and are registered by the Agencia de Protección al Ambiente (EPA) of the United States of America (Santamaría-Basulto *et al.*, 2011).

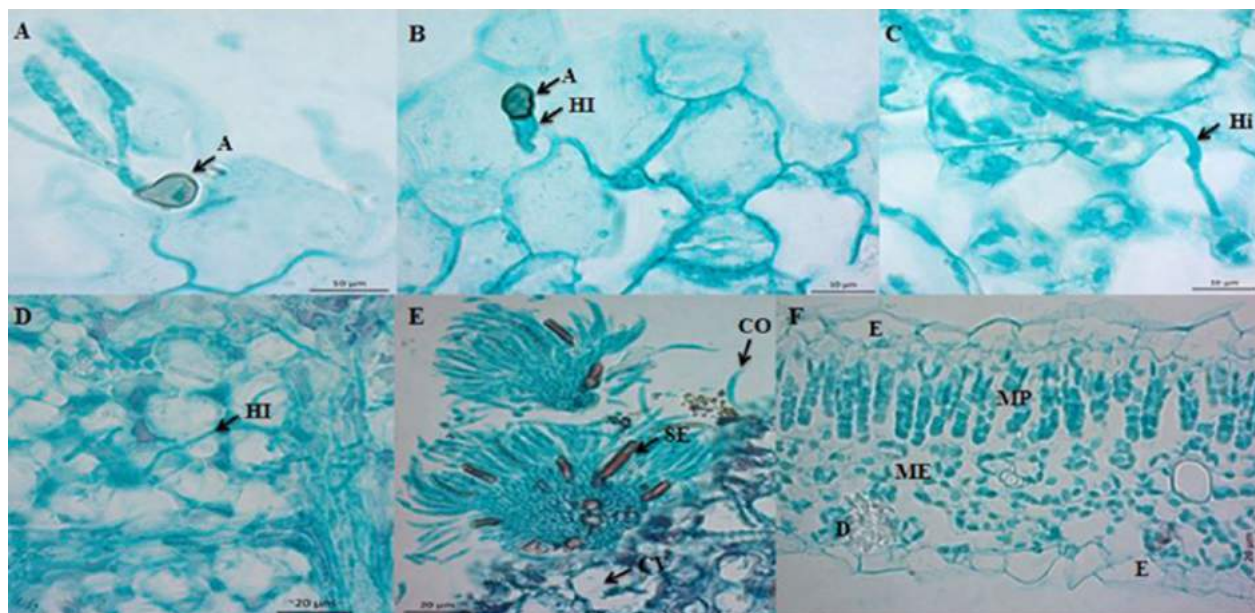


Figura 4. Colonización intramural subcuticular de *C. truncatum* en hojas escindidas de papaya cv. Maradol (Tomado de Rojo-Báez et al., 2016). A) y B) Penetración, A=apresorio, HI= hifa de infección; C) y D) Colonización, Hi= hifa intramural, HI= hifa intracelular; E) Reproducción, acérvulos con CO=conidios y SE=setas y F) Tejido sano, E=epidermis, MP=mesófilo en empalizada, ME=mesófilo esponjoso y D=drusa.

Figure 4. Intramural subcuticular colonization of *C. truncatum* in split papaya leaves cv. Maradol (Taken from Rojo-Báez et al., 2016). A) and B) penetration, A=appressorium, HI= hyphae from infection; C) y D) Colonization, Hi= intramural hyphae, HI= intracellular hyphae; E) Reproduction, acervuli with CO=conidia and SE=setae and F) healthy tissue, E=epidermis, MP=mesophyll palisade, ME=spongy mesophyll and D=druse.

como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chicharo, por lo que la estrategia de infección depende del hospedante.

Además, Rojo-Báez *et al.* (2017) estudiaron el proceso de infección de *C. truncatum* en su interacción con fruto de papaya. La penetración directa por medio de apresorios ocurrió a las 30 hdi, las hifas intramurales crecieron en paredes celulares de la epidermis entre 30-48 hdi, la colonización necrotrofica inició a las 72 hdi causando una extensa degradación en células de parénquima y el rompimiento de cutícula por medio de acérvulos ocurrió entre 96-148 hdi. Las observaciones microscópicas en frutos de papaya revelaron que *C. truncatum* utiliza la estrategia de infección intramural subcuticular.

In Mexico, there are pesticides whose use is banned or restricted due to their high risk to human health; there are also fungicides such as benzimidazoles, maneb and captafol, that are banned in other countries but whose use is authorized in Mexico. The reason that pesticides that have been taken off the market and banned in developed countries such as the US and Japan can be used in Mexico is possibly that Mexico's pesticide regulations have not been updated and there is no constant monitoring to provide reliable results for establishing policies on pesticide use and management (Gutierrez-Alonso *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2013).

On the other hand, it has been reported that because of the constant use of synthetic fungicides,

CONTROL

El control de enfermedades producidas por *Colletotrichum/Glomerella* depende principalmente de prácticas culturales tales como el uso de semillas libres de enfermedad, rotación de cultivos, variedades vegetales resistentes, remoción de ramas muertas y frutos infectados; tratamiento físico (ejemplo: tratamiento hidrotérmico, ozono y atmósferas modificadas en frutos); control químico (fungicidas) y biológico (extractos de plantas, microorganismos antagonistas) (Phoulivong, 2011; Landero-Valenzuela *et al.*, 2016).

Dentro del control químico, los fungicidas de la clase benzimidazol y estrobilurinas (actúan inhibiendo la división nuclear y la respiración mitocondrial, respectivamente) se usan ampliamente en campo, estos fungicidas se encuentran vigentes en el registro sanitario de plaguicidas de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Torres-Calzada *et al.*, 2015; COFEPRIS, 2017); además, fungicidas como azoxystrobin, clorotalonil, mancozeb y tiabendazol se usan para el control de antracnosis en papaya y cuentan con registro por parte de la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) de los Estados Unidos de América (Santamaría-Basulto *et al.*, 2011).

En México, existen plaguicidas prohibidos y restringidos por su alto riesgo en la salud humana; además existen fungicidas de la clase benzimidazoles, maneb y captafol, los cuales están prohibidos en otros países pero están autorizados en México. El uso de plaguicidas que se han retirado del mercado y se ha prohibido su uso en países desarrollados como EEUU y Japón, puede deberse a la falta de actualización en la regulación de plaguicidas en México, así como la falta de monitoreo continuo que proporcione resultados certeros para establecer políticas de uso y manejo de plaguicidas (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2013).

Colletotrichum isolates have developed resistance. For example, Torres-Calzada *et al.* (2015) reported *C. truncatum* isolates resistant to azoxystrobin and tiabendazole, and susceptible to mancozeb and cyprodinil-fludioxonil fungicides. This confirms that the resistance to tiabendazol is caused by a mutation in the β -tubulin gen caused by the replacement of glutamic acid by alanine. The presence of resistant isolates to some chemical products has increased the interest in creating other control methods that are effective and safe for the end users and the environment, such as biological control.

There are examples of biological control of anthracnose in apple, papaya, avocado and mango, among other crops (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005; Landero-Valenzuela *et al.*, 2016). *Bacillus subtilis* is widely used to control anthracnose due to its competitive and antibiotic antagonistic potential. Carrillo-Fasio *et al.* (2005) evaluated the efficacy of *B. subtilis*, *Rhodotorula minuta* and their combination in postharvest applications for controlling anthracnose (caused by *C. gloeosporioides*) in mango at postharvest level. The combination of *R. minuta* plus *B. subtilis* ($10^6 + 10^4$ ufc mL⁻¹) was better than the chemical control (benomyl), which was promising for its commercial use. Furthermore, Patiño-Vera *et al.* (2005) developed a fermentation process at plant level-pilot to produce *R. minuta* yeast and then developed a low-cost formula to reduce anthracnose in mango.

Resistance inducers are also part of the methods for the control of *Colletotrichum* spp. Resistance induction to pathogens includes the use of physical, chemical and biological elicitors, including salicylic and jasmonic acids (Landero-Valenzuela *et al.*, 2016). Other studies have been conducted focused on cultivar characterization of species resistant to *Colletotrichum*. Rodríguez-Guerra *et*

Por otro lado, se ha reportado que el uso continuo de fungicidas sintéticos ha generado resistencia en cepas de *Colletotrichum*. Por ejemplo, Torres-Calzada *et al.* (2015) determinaron que en *C. truncatum* existieron aislados resistentes a los fungicidas azoxystrobin y tiabendazol, y susceptibles a los fungicidas mancozeb y cyprodinil-fludioxonil; confirmando que la resistencia a tiabendazol se debe a una mutación en el gen β -tubulina debido a la sustitución de ácido glutámico a alanina. La presencia de cepas resistentes, a algunos productos químicos, ha incrementado el interés por desarrollar otros métodos de control que sean efectivos y seguros para el consumidor y el ambiente, tal es el caso del control biológico.

Existen ejemplos del control biológico de antracnosis en manzana, papaya, aguacate, mango, entre otros (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005; Landero-Valenzuela *et al.*, 2016). *Bacillus subtilis* es ampliamente utilizada en el control de antracnosis debido a su potencial antagonista por competencia y antibiosis. Carrillo-Fasio *et al.* (2005) evaluaron la efectividad de *B. subtilis*, *Rhodotorula minuta* y su combinación en aplicaciones precosecha para el control de antracnosis (ocasionada por *C. gloeosporioides*) en mango a nivel postcosecha. La combinación de *R. minuta* más *B. subtilis* ($10^6 + 10^4$ ufc mL⁻¹), superó al control químico (benomil), lo que resultó prometedor para su uso comercial. Además, Patiño-Vera *et al.* (2005) desarrollaron un proceso de fermentación a nivel planta-piloto para la producción de la levadura *R. minuta*, lo que permitió desarrollar una formulación de bajo costo para la reducción de antracnosis en mango.

Por otra parte, los inductores de resistencia también forman parte del control de *Colletotrichum* spp. La inducción de resistencia a patógenos incluye el uso de elicitores físicos, químicos y biológicos; como por ejemplo el ácido salicílico y el ácido jasmónico, entre otros (Landero-Valenzuela *et al.*,

al. (2006) suggested resistance genes in improved bean cultivars of commercial value in Mexico such as Negro INIFAP (that contains the resistance genes Co-1) and Negro 8025 (genes Co-6 or Co-8) resistant to most *C. lindemuthianum* pathotypes.

CONCLUSIONS

Colletotrichum species are important pathogens due to its wide range of hosts. In Mexico, this species has been identified mainly at the morphological level, but in recent studies a more extensive identification has been conducted based on morphological characterization and molecular analysis. Due to the existing complex of *Colletotrichum* species, in addition to the analysis of ITS regions, we need to include additional conserved regions. The major species reported in Mexico at morphological and molecular level are *C. gloeosporioides* and *C. truncatum*. Studies have been also conducted on pathogenesis and control for these species, but we still need to conduct further studies for other *Colletotrichum* spp. in order to establish future control strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

To the project 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” funded by SAGARPA, and to CONACyT for funding the studies of I. Rojo-Báez.

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

2016). Además, se han realizado estudios enfocados a la caracterización de cultivares resistentes a especies de *Colletotrichum*. Rodríguez-Guerra *et al.* (2006) postularon genes de resistencia en

cultivares mejorados de frijol de valor comercial en México como Negro INIFAP (el cual posee los genes de resistencia Co-1) y Negro 8025 (genes Co-6 o Co-8), los cuales son resistentes a la mayoría de los patotipos de *C. lindemuthianum*.

## CONCLUSIONES

Las especies de *Colletotrichum* son patógenos importantes debido a su amplio rango de hospedantes. En México, la identificación de especies es principalmente a nivel morfológico; sin embargo, en estudios recientes se ha realizado una identificación integral, la cual se basa en caracterización morfológica y análisis molecular. Debido al complejo de especies que existen en *Colletotrichum*, además del análisis de regiones ITS, es necesario incluir regiones conservadas adicionales. Las principales especies reportadas en México a nivel morfológico y molecular son *C. gloeosporioides* y *C. truncatum*; se han realizado estudios sobre patógenesis y control en estas especies; sin embargo, es necesario ampliar los estudios al resto de *Colletotrichum* spp. para establecer futuras estrategias de control.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA, al CONACyT por el financiamiento a los estudios de I. Rojo-Báez.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez MG. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71:169 p.
- Ávila-Quezada G, Silva-Rojas HV and Teliz-Ortiz D. 2007. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. *Plant Disease* 91:1200. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1200A>
- Barnett H y Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. Minesota, USA. 197p.
- Benítez-Camilo FA., Huerta-Palacios G, Holguín-Meléndez F y Toledo-Arreola J. 2003. Efecto de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en la caída de frutos de mango cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:223-227. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221218>
- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller JM, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC and Johnston PR. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39:183-204. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-8.pdf>
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR and Weir BS. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0014>
- Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Muy-Rangel MD, Sañudo-Barajas A, Márquez-Zequera I, Allende-Molar R, de la Garza-Ruiz Z, Patiño-Vera M y Galindo-Fentanes E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad postcosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:24-32. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223104>
- Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Gutierrez-Alonso JG. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:88-93. Disponible en línea: <http://www.socmexfito.org/2014-01-08-17-34-56/2013-06-19-02-09-15/001-vol-20/101-revista-smf/2002/001/234-histopatologia-de-frutos-de-papaya-carica-papaya-l-infectados-por-colletotrichum-gloeosporioides-penz>
- Casarrubias-Carrillo U, González-Chavira MM, Cruz-Hernández A, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Guevara-González RG. 2003. Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:338-345. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221315>
- COFEPRIS, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2017. Registro sanitario de plaguicidas y nutrientes vegetales. <http://www.cofepris.gob.mx> (Consulta, Febrero 2017).
- Cristóbal-Martínez AL, Yáñez-Morales MJ, Solano-Vidal R, Segura-León O and Hernández-Anguiano AM. 2017. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 147:605-614. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-1029-0>
- Crouch JA, Clarke BB, White JFF and Hillman BI. 2009a. Systematic analysis of the falcate spored gramminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. *Mycologia* 101:717-732. <http://dx.doi.org/10.3852/08-230>
- Crouch JA, Clarke BB and Hillman BI. 2009b. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-

- spored gramminicolous *Colletotrichum* group. Mycologia 101:648-656. <http://dx.doi.org/10.3852/08-231>
- Crouch JA, O'Connell R, Gan P, Buiate E, Torres MF, Beirn L, Shirasu K and Vaillancourt L. 2014. The genomics of *Colletotrichum*. Pp. 69-102. In: Dean RA, Lichens-Park A y Kole C (eds.) Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens. Vol 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Alemania. 201p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-44053-7>
- Damm U, Woudenberg JHC, Cannon PF and Crous PW. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous host. Fungal Diversity 39:45-87. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/jinds3.php#vol39>
- Damm U, Baroncelli R, Cai L, Kubo Y, O'Connell R, Weir B, Yoshino K and Cannon PF. 2010. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. International Mycological Association Fungus 1:161-165. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348780/>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC and Crous PW. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. Studies in Mycology 73:37-113. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0010>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG and Crous PW. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies in Mycology 73:1-36. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0002>
- Damm U, Cannon PF, Liu F, Barreto RW, Guantimosim E and Crous PW. 2013. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. Fungal Diversity 61:29-59. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-013-0255-4>
- Damm U, O'Connell RJ, Groenewald JZ and Crous PW. 2014. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. Studies in Mycology 79:49-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.003>
- Dean R, Van JAL, Preorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di PA, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13:414-430. <http://dx.doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.x>
- Farr DF, Aime MC, Rossman AY and Palm ME. 2006. Species of *Colletotrichum* on *Agavaceae*. Mycological Research 110:1395-1480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2006.09.001>
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Gregorio-Cipriano MR y Fernández-Pavía L. 2012. Enfermedades en plantas en el estado de Michoacán. Biológicas 14:75-89. Disponible en línea: <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/view/140>
- Fernández-Pavía SP, Gregorio-Cipriano R, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía L, Mondragón FA, Gómez-Dorantes N, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Fernández R y Herrera CJ. 2015. Enfermedades de especies vegetales en México. Primera edición. Morevalladolid. Morelia, Michoacán, México. 425p.
- Fraire-Cordero ML, Yáñez Morales MJ, Nieto-Ángel D, y Vázquez-Gálvez G. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21:285-291. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221307>
- Fucikovskiy L and Luna I. 1987. Avocado fruit diseases and their control in Mexico. South African Avocado Growers' Association Yearbook 10:119-121. Disponible en línea: <http://www.avocadosource.com>
- Groenewald-Labrada B, Mayek-Pérez N y Padilla-Ramírez JS. 2003. Hongos asociados a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:375-378. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221320>
- Gutiérrez-Alonso O, Nieto-Ángel D, Gutiérrez-Alonso JG, Delgadillo-Sánchez F. y Domínguez-Álvarez JL. 2002. Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 20:24-30. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220105>
- Gutiérrez-Alonso JG, Gutiérrez-Alonso O, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Zavaleta-Mejía E y Delgadillo-Sánchez F. 2004. Manejo integrado de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] del mango (*Mangifera indica* L.) durante la postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 22:395-402. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222313>
- Hernández-Lauzardo AN, Campos-Martínez A, Velázquez-del Valle MG y Flores-Moctezuma HE. 2015. First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. Plant Disease 99:555. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1019-PDN>
- Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U et al. 2009a. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39:147-182. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-7.pdf>
- Hyde KD, Cai L, McKenzie EHC, Yang YL, Zhang JZ and Prihastuti H. 2009b. *Colletotrichum*: a catalogue of confusión. Fungal Diversity 39:1-17. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-1-E.pdf>
- Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE, et al. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). Fungal Diversity 67:21-125. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>
- Lagunes-Castro MS, López-Monteon A, Ramos-Ligonio A, Trigos A, Salinas A y Espinoza C. 2015. Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 87-94. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687008>
- Landero-Valenzuela N, Lara-Viveros FM, Andrade-Hoyos P, Aguilar-Pérez LA y Aguado RGJ. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7:1189-1198. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146723018>
- Leyva-Mir SG, Soto-Herrera A, Espitia-Rangel E, Villaseñor-Mir HE, González-Iñiguez RM y Huerta-Espino J. 2004. Etiología e incidencia de la antracnosis [*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils.] de la avena (*Avena sativa* L.) en Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:351-355. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222306>
- Lira-Saldivar RH, Hernández-Suárez M and Hernández-Castillo FD. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (D.C.) Coville

- L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12:211-216. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912212>
- Macedo CA, Martínez HA y Lara RJ. 2012. Rizobacterias aisladas del trópico húmedo con actividad antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, evaluación cuantitativa e identificación molecular. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:11-30. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225129002>
- Marin DH, Sutton TB, Blankenship SM and Swallow WH. 1996. Pathogenicity of fungi associated with Crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. *Plant Disease* 80:525-528. Disponible en línea: [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Abstracts/PD\\_80\\_525.htm](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Abstracts/PD_80_525.htm)
- Martínez-Bolaños M, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D, García-Pérez E y Sánchez-López V. 2015. Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Litchi Fruit (*Litchi chinensis* Soon.) in Oaxaca, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:140-155. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145002>
- Montes-Belmont R, Nava-Juárez RA, Flores-Moctezuma HE y Mundo-Ocampo M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:300-304. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221309>
- Nava-Díaz C, Osada-Kawasoe S, Rendón-Sánchez G y Ayala-Escobar V. 2000. Organismos asociados a Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) en Michoacán, México. *Agrociencia* 34:217-226. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30234211>
- Orozco-Santos M, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Fariás-Larios J y Timmer LW. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:423-428. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222316>
- Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Sandoval- Islas JS, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L y Alejo-Jaimes A. 2015. Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad "Pata Prieta" de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 173-194. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145004>
- Patiño-Vera M, Jiménez B, Balderas K, Ortiz M, Allende R, Carrillo A and Galindo E. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology* 99:540-550. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02646.x>
- Pérez MA, Navarro H y Miranda E. 2013. Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29:45-64. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37028958003>
- Perfect ES, Hughes BH, O'Connell JR and Green RJ. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Phoulivong S. 2011. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 1:53-75. Disponible en línea: <http://www.creamjournal.org/volume-1/issue-1.html>
- Quijano-Ramayo A, Herrera-Herrera JL, Canul-Salazar M. y Robert ML. 2002. Microbial diseases affecting henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) in Yucatan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:18-23. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220104>
- Réblová M, Gams W and Seifert KA. 2011. *Monilochaetes* and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the *Microascales*. *Studies in Mycology* 68:163-191. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2011.68.07>
- Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Rueda MT, Martínez VO and Simpson J. 2003. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. *Plant Pathology* 52:228-235. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00808.x>
- Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Rueda MT, Cabral-Enciso M, García-serrano M, Lira-Maldonado Z and Guevara-González G. 2005. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia* 97:793-803. <http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.97.4.793>
- Rodríguez-Guerra R, Acosta-Gallegos JA, González-Chavira MM y Simpson J. 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura Técnica en México* 32:101-114. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0568-25172006000100010](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172006000100010)
- Rodríguez-López ES, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Delgado S, Gutiérrez-Diez A y Mayek-Pérez N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35:898-905. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000300029>
- Rodríguez-Tovar A, Xoconostle-Cásarez B y Valdés M. 2004. Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:267-278. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61027307>
- Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2016. Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chicharo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 316-325. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-3>
- Rojo-Báez I, García-Estrada RS, Sañudo-Barajas A, León-Félix J y Allende-Molar R. 2017. Proceso de infección de antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol. *Revista Brasileira de Fruticultura* 39: 1-5. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017379>
- Sánchez-García BM, Flores-olivas A, Sánchez-Arizpe A, Pineda-Rodríguez S, López-Jiménez G, Fraire-Velásquez S, Garrido-Ramírez ER, Acosta-Gallegos JA, Simpson WJ y Rodríguez-Guerra R. 2009. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* en Oaxaca y San Luis Potosí, México y resistencia en genotipos de frijol. *Agricultura Técnica en México* 35:49-60. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60835105>

- Santamaría-Basulto F, Díaz-Plaza R, Gutiérrez-Alonso O, Santamaría-Fernández J y Larqué-Saavedra A. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* y su efecto sobre el color y sólidos solubles totales en frutos de papaya Maradol. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 12:19-27. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81318808004>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109:6241-6246. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Silva-Rojas HV and Ávila-Quezada GD. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. Plant Pathology 60:899-908. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>
- Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Lappe P, Larque-Saavedra A and Perez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan peninsula. Molecular Biotechnology 40:293-298. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>
- Tapia-Tussell R, Cortes-Velázquez A, Valencia-Yah, Navarro C, Espinosa E, Moreno B and Perez-Brito D. 2016. First report of *Colletotrichum magnum* causing anthracnose in papaya in Mexico. Plant Disease 100:2323. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0324-PDN>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Garcez-Nexticapan A, Matin-Mex R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Higuera-Ciapara I and Perez-Brito D. 2011a. First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico. New Disease Reports 23:6. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.023.006>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Matin-Mex R, Rojas-Herrera R, Higuera-Ciapara I and Pérez-Brito D. 2011b. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. Molecular Biotechnology 49:48-55. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-011-9377-7>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I and Perez-Brito D. 2013. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). European Plant Pathology 135:67-79. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I, Martin-Mex R, Nexticapan-Garcez A, and Perez-Brito D. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. Plant Disease 99:1590-1595. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1183-RE>
- Udayanga D, Manamgoda DS, Liu X, Chukeatirote E and Hyde KD. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? Fungal Diversity 61:165-179. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-013-0257-2>
- Velázquez-del Valle MG, Campos-Martínez A and Flores-Moctezuma HE. 2016. First report of avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. Plant Disease 100:534. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0249-PDN>
- Villanueva-Arce R, Hernández-Anguiano AM, Yáñez-Morales MJ, Téliz-Ortíz D, Mora-Aguilera A, Cárdenas-Soriano E y Castañeda-Vildózola A. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. Agrociencia 39:93-106. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239109>
- Villanueva-Arce R, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Anguiano AM, Mora-Aguilera A y Téliz-Ortíz D. 2006. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. Agrociencia 40:773-782. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30240609>
- Villanueva-Arce R, Yáñez-Morales MJ, Téliz-Ortíz D y Hernández-Anguiano AM, 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Agrociencia 42:689-701. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30211218009>
- Weir BS, Johnston PR and Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73:115-180. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0011>
- Zhang N, Castlebury LA, Miller AN, Huhndorf SM, Schoch CL, Seifert KA, Rossman AY, Rogers JD, Volkman-Kohlmeyer JKB and Sung GH. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. Mycologia 98:1076-1087. <http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.98.6.1076>
- Zhang N, Rossman AY, Seifert K, Bennett JW, Cai G, Cai L, Hillman B, Hyde KD, Luo J, Manamgoda D, Meyer W, Molnar T, Schoch C, Tadych M and White JF Jr. 2013. Impacts of the International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) on the scientific names of plant pathogenic fungi. APS Feature. <http://dx.doi.org/10.1094/APSFeature-2013-06>
- Zavala-león MJ, Tun-Suárez JM, Cristóbal-Alejo J, Ruiz-Sánchez E, Gutiérrez-Alonso O, Vázquez-Calderón M y Méndez-González R. 2005. Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. Revista Chapingo Serie Horticultura 11:251-255. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60911210>

# *Vasconcellea cauliflora* resistance to *Papaya ringspot potyvirus* (PRSV-P) and its introgression in *Carica papaya*

## Resistencia de *Vasconcellea cauliflora* al *Virus de la mancha anular de la papaya-potyvirus* (PRSV-P) y su introgresión en *Carica papaya*

**Daniela Ordaz-Pérez**, Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Blvd. Príncipe Akishino s/n colonia Solidaridad 2000, Tapachula, Chiapas, C.P. 30798, México; **Josué Gámez-Vázquez**, Campo Experimental Bajío-INIFAP, Km 6.5 carretera Celaya a San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato, C.P. 38010, México; **Jesús Hernández-Ruiz**, **Edgar Espinosa-Trujillo\***, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Km 9 carretera Irapuato-Silao, ExHda. El Copal, Irapuato, Guanajuato, C.P. 36500, México; **Patricia Rivas-Valencia**, Campo Experimental Valle de México-INIFAP, Km. 13.5 carretera Los Reyes-Texcoco, Coatlinchán, Texcoco Estado de México, C.P. 56250, México; **Ivonne Castro-Montes**, Investigador independiente. \*Autor para correspondencia: e.espinosa@ugto.mx.

**Recibido:** 16 de Marzo, 2017.

**Aceptado:** 27 de Julio, 2017.

Ordaz-Pérez D, Gámez-Vázquez J, Hernández-Ruiz J, Espinosa-Trujillo E, Rivas-Valencia P, Castro-Montes I. 2017. *Vasconcellea cauliflora* resistance to *Papaya ringspot potyvirus* (PRSV-P) and its introgression in *Carica papaya*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 571-590.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1703-4

Primera publicación DOI: 30 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 30, 2017.

**Resumen.** El cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) posee gran importancia económica, la cual es afectada por enfermedades causadas por virus, principalmente transmitidas por áfidos vectores. Aunque las prácticas convencionales de control de vectores parecen mantener al margen la propagación del virus, no es suficiente para evitar pérdidas en la producción. Existen desarrollos de la ingeniería genética que permiten obtener plantas resistentes

**Abstract.** Papaya is a crop of major economic importance, but it is threatened by the presence of viral diseases that are mainly transmitted by vector insects. Although conventional pest control practices seem to keep out the spread of the virus, it is not enough to avoid production losses. There are some molecular tools from genetic engineering to obtain disease resistant plants with potential to solve the problem. This review is an information compilation about the problem caused by virus with more impact on papaya production: *Papaya ringspot potyvirus* (PRSV-P) and *Papaya mosaic virus* (PapMV), their genetic variability and some strategies used to develop disease resistant hybrids resulting from the recombination between *Vasconcellea* genus and *Carica papaya* commercial varieties.

**Key words:** Intergeneric hybrids, viruses, genetic improvement.



a las enfermedades virales. En la presente revisión, se aborda la problemática asociada a los virus con mayor impacto para el cultivo de la papaya: *Papaya ringspot potyvirus* (PRSV-P) y el *Papaya mosaic virus* (PapMV), su variabilidad genética y las estrategias de mejoramiento genético que han permitido la generación de poblaciones resistentes a través de la recombinación de especies del género *Vasconcellea* con variedades comerciales de *Carica papaya*.

**Palabras clave:** Híbridos intergenéricos, virus, mejoramiento genético.

La familia Caricaceae se divide en seis grupos constituidos por 35 especies, distribuidos ampliamente en el mundo. En África tropical se encuentran dos especies del género *Cylicomorpha*, en América Central se encuentran los géneros endémicos *Horovitzia* y *Jarilla*, además de *Jacaratia* y *Vasconcellea* que se encuentran en América del Sur (Antunes y Renner, 2014). La especie *Carica papaya* silvestre se encuentra extendida en bosques tropicales que van de México hasta Costa Rica (Chávez-Pesqueira *et al.*, 2014). La versión hermafrodita de *C. papaya* cultivada es producto de la domesticación por grupos étnicos de México, presumiblemente los mayas (VanBuren *et al.*, 2015).

Por lo anterior, se considera a los países de América Central y del Sur como centros de diversidad genética y biológica de la papaya e idóneos para la producción comercial del cultivo. Sin embargo, en México la papaya enfrenta varios problemas fitopatológicos de relevancia. Las enfermedades virales, transmitidas por insectos vectores, ocasionan pérdidas hasta del 90% de la plantación; es decir, hay merma en la densidad de plantas (Mora *et al.*, 1992).

The family Caricaceae is classified in six groups formed by 35 species widely distributed worldwide. Two species of the *Cylicomorpha* genus are in tropical Africa, while the endemic *Horovitzia* and *Jarilla* genera prevail in Central America, and *Jacaratia* and *Vasconcellea*, in South America (Antunes and Renner, 2014). *Carica papaya* wild species are widely distributed in tropical forests from Mexico up to Costa Rica (Chávez-Pesqueira *et al.*, 2014). The hermaphrodite version of *C. papaya* currently sown is the result of domestication by Mexican ethnic groups, presumably the Mayas (VanBuren *et al.*, 2015).

For this reason, Central and South American countries are considered the centers of genetic and biological diversity and suitable for papaya commercial production. However, in Mexico, papaya production is affected by major relevant phytopathological problems such as viral diseases caused by vector insects resulting in losses of 90% in plantations, i.e., reductions in plant density (Mora *et al.*, 1992).

At least 12 viruses are reported worldwide that pose a threat to papaya production: *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya leaf curl virus* (PaLCV), *Chilli leaf curl virus* (ChiLCuV), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), *Croton yellow vein mosaic virus* (CYVMV), *Papaya droopy necrosis virus* (PDNV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) and *Papaya meleira virus* (PMeV) (Mishra *et al.*, 2015).

From these viruses, those of major importance in Mexico are PRSV-P, PapMV and PMeV, which are a problem because of the economic losses they cause (Silva-Rosales *et al.*, 2010; Rivas-Valencia *et al.*, 2008). Infections produced by those viruses

En el mundo se reportan, al menos, 12 virus que representan una amenaza para la producción de fruta de papaya: *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya leaf curl virus* (PaLCV), *Chilli leaf curl virus* (ChiLCuV), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), *Croton yellow vein mosaic virus* (CYVMV), *Papaya droopy necrosis virus* (PDNV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) y *Papaya meleira virus* (PMeV) (Mishra *et al.*, 2015).

De ellos, los de mayor importancia en México son el PRSV-P, PapMV y PMeV, los cuales representan un problema por las pérdidas económicas causadas (Silva-Rosales *et al.*, 2010; Rivas-Valencia *et al.*, 2008). Esto por efecto de reducción del rendimiento de fruta por hectárea, lo cual reduce el ingreso neto por hectárea hasta 275% (Yorobe, 2009). El mayor impacto en la producción de papaya se debe, principalmente, a que ninguna de las variedades comerciales presenta resistencia genética al PRSV-P y al PMeV (Abreu *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2005); sin embargo, se ha reportado que algunas variedades no comerciales presentan bajos niveles de susceptibilidad (Rodríguez *et al.*, 2013).

El PRSV-P es uno de los virus que provoca mayor daño en la productividad de papaya, que alcanza valores superiores al 70% (Tennant *et al.*, 2007); en contraste, los efectos del PapMV no son tan agresivos. De forma natural la papaya hospeda ambos virus al mismo tiempo (Noa-Carranza *et al.*, 2006), por lo cual pueden presentarse dos eventos: 1) Sinergismo, infección primaria por el PRSV-P y posteriormente la infección del virus PapMV, 2) Antagonismo, que se desarrolla con la primera infección de PapMV y posteriormente por PRSV-P, lo que sugiere que PapMV activa la respuesta de defensa en cascada en la planta infectada (Chávez-Calvillo *et al.*, 2016).

reduce fruit yield per hectare that in turn reduces up to 275% the net income per hectare (Yorobe, 2009). The highest impact on papaya production is mainly due to the fact that none of the commercial varieties has genetic resistance to PRSV-P or PMeV (Abreu *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2005). However, some non-commercial varieties have been reported to have low levels of susceptibility (Rodríguez *et al.*, 2013).

PRSV-P is one of the viruses causing the greatest damage to papaya productivity with values higher than 70% (Tennant *et al.*, 2007); in contrast, the effects of PapMV are not so aggressive. Papaya naturally hosts both virus at the same time (Noa-Carranza *et al.*, 2006), and for this reason two events may take place: 1) Synergism, which is the primary PRSV-P infection followed by PapMV infection; 2) Antagonism, that results from the first PapMV infection followed by PRSV-P infection, which suggests that PapMV activates a cascade pathway in defense response in the infected plant (Chávez-Calvillo *et al.*, 2016).

An alternative for developing genetic resistance to PRSV-P is to genetically transform somatic embryos obtained *in vitro* (or any other explant) using *Agrobacterium* (strain C58-Z707) or particle pumping. The gene transferred to papaya is the one encoding the capsid protein of a specific virus isolate. However, if the transgene is built with the sequence of a local virus, there is a relatively high probability that the transgenic plants do not develop resistance to viruses from other geographical origin (Mishra *et al.*, 2015). Two transgenic varieties of papaya of the Solo morphotype are currently available in the international market (Rainbow and SunUp) (Mishra *et al.*, 2015) that are characterized by being small fruits weighing from 300 to 600 g; they were modified using the PRSV-P HA 5-1 strain originally from Hawaii (Gonsalves, 2006).

As an additional alternative, 31 varieties of *C. papaya* (primary genetic pool) were evaluated to

Una de las alternativas para generar resistencia genética al virus PRSV-P es la transformación genética de embriones somáticos obtenidos *in vitro*, o de algún otro explante, por medio de *Agrobacterium* (cepa C58-Z707) o con el bombeo de partículas. El gen transferido a la papaya es el que codifica la proteína de la cápside de un aislamiento viral determinado; sin embargo, si el transgen es construido con la secuencia de un virus local, entonces se genera una probabilidad relativamente alta de que las plantas transgénicas no sean resistentes a los virus de otro origen geográfico (Mishra *et al.*, 2015). Actualmente están disponibles en el mercado internacional dos variedades transgénicas (Rainbow y SunUp) de frutos del morfotipo Solo (Mishra *et al.*, 2015), las cuales se caracterizan por ser de fruto pequeño con peso de 300 a 600 g, y fueron modificadas utilizando el gen del PRSV-P cepa HA 5-1 originaria de Hawaii (Gonsalves, 2006).

Como otra alternativa, se han evaluado 31 variedades de *C. papaya* (acervo genético primario) en búsqueda de resistencia genética, pero solo se ha identificado tolerancia en la variedad Califlora (Roff, 2007). Por tal razón se ha identificado la resistencia genética al PRSV-P, en la especie *Vasconcellea cauliflora* (acervo genético secundario) para posteriormente introducirla (introgresión) a los materiales del *C. papaya*, mediante técnicas de mejoramiento convencionales (Yanthan *et al.*, 2017).

Toda vez que en México está prohibido el establecimiento de papaya transgénica (NOM-056-FITO-1995), la presente revisión aborda el avance del conocimiento en la introgresión de la resistencia genética a virus PRSV-P, a partir de algunas especies del género *Vasconcellea*, mediante su recombinación con *C. papaya*, como alternativa para generar resistencia genética.

### Diversidad genética viral

El PRSV pertenece al género *Potyvirus*, familia Potyviridae. Estos virus son transmitidos por semilla,

find genetic resistance, but only tolerance was found in the Califlora variety (Roff, 2007). For this reason, genetic resistance to PRSV-P was identified in *Vasconcellea cauliflora* species (secondary genetic pool) that was later introduced (introgression) in *C. papaya* materials using conventional improvement techniques (Yanthan *et al.*, 2017).

Given that in Mexico the establishment of transgenic papaya is banned (NOM-056-FITO-1995), this review is intended to update progress on introgression of resistance to the PRSV-P, virus from some species of the *Vasconcellea* genus by recombining them with *C. papaya*, as an alternative for developing genetic resistance.

### Viral genetic diversity

PRSV belongs to the genus *Potyvirus*, family Potyviridae. These viruses are transmitted by seed, mechanical means and over 25 aphid species in a non-persistent way, a distinctive feature of the group. There are two biotypes: “P” that infects papaya and “W” that damages some members of the cucurbit family, such as watermelon (*Citrullus lanatus*) and melon varieties (*Cucumis melon*) (Tripathi *et al.*, 2008).

The genetic variability of PRSV-P is as wide as the diversity of ecological niches where papaya is grown. According to Bateson *et al.* (2002), there is 12% of variability in the nucleotidic sequence among geographic regions such as Asia, Australia and North America. It has also been suggested that it first appeared in Asia from where it spread to the rest of the world.

In Mexico, PRSV-P was first reported in the state of Veracruz in 1964. So far, five genetic groups have been reported to be distributed across the Pacific coast, the Gulf coast, Cotaxtla regions (Veracruz), the Yucatán peninsula and the western Pacific coast (Noa-Carranza *et al.*, 2006). Within this diversity, two isolates from Veracruz and one from Chiapas are highly correlated with isolates from North

de forma mecánica y por más de 25 especies de áfidos de forma no persistente, lo que constituye una característica distintiva del grupo. Existen dos biotipos: el “P” que infecta a la papaya y el “W” que ataca a cucurbitáceas como la sandía (*Citrus lanatus*) y a las variedades del Melón (*Cucumis melon*) (Tripathi *et al.*, 2008).

La variabilidad genética del PRSV-P es tan amplia como la diversidad de los nichos ecológicos en donde se cultiva la papaya. De acuerdo con Bateson *et al.* (2002), existe variabilidad en la secuencia nucleotídica del 12% entre regiones geográficas, tales como Asia, Australia y América del Norte. Además, se ha propuesto que Asia es su centro de origen y de ahí se propagó al resto del mundo.

En México, el primer informe de la presencia del PRSV-P fue registrado en Veracruz en 1964. Actualmente se reportan cinco grupos genéticos que se distribuyen en la costa del Pacífico, la costa del Golfo, regiones de Cotaxtla (Veracruz), la península de Yucatán y la costa occidental del Pacífico (Noa-Carranza *et al.*, 2006). Dentro de esa diversidad, dos aislamientos de Veracruz y una de Chiapas están fuertemente correlacionadas con aislamientos de América del Norte y Australia; a la vez, todos estos aislamientos son genéticamente diferentes a los de China, Taiwán, Vietnam e India (Silva-Rosales *et al.*, 2000).

Se han secuenciado 22 genomas completos del PRSV-P procedentes de varios países, y los análisis filogenéticos revelan que los aislamientos se agrupan en función de su país de origen; de esta forma Taiwán, China, Tailandia e India integran un grupo, y un segundo grupo se conforma por los aislamientos del continente americano (Brasil, México, Estados Unidos) (Mishra *et al.*, 2015). En contraposición, los análisis de nucleótidos de los genes de proteína de la cápside de muestras virales colectadas en Cuba (7 muestras) y Brasil (21 muestras), indicaron que la distancia genética entre ellas varió de 0% a 9.2%. Los análisis dentro de cada país

America and Australia, they are also genetically different from those from China, Taiwan, Vietnam and India (Silva-Rosales *et al.*, 2000).

Twenty-two complete PRSV-P genomes from several countries have been sequenced, and the phylogenetic analyses show that the isolates are grouped according to their country of origin. Therefore, Taiwan, China, Thailand and India form one group, and a second group includes isolates from the Americas (Brazil, Mexico, United States) (Mishra *et al.*, 2015). In contrast, nucleotide analyzes of the capsid protein genes from virus samples collected in Cuba (7 samples) and Brazil (21 samples) show that the genetic distance among them ranged from 0% to 9.2%. Analyses performed in each country showed formation of genetic subgroups according to the geographic regions where the samples were taken, i.e., there is higher similarity among isolates from neighboring regions. However, when genetic information from the virus GenBank was included, two groups with 86% maximum genetic similarity were identified. The first group included viruses from India, Hawaii, Mexico, Venezuela, Cuba and Brazil, and the second, viruses from China, Taiwan, Thailand, South Korea and Malaysia (Rodríguez *et al.*, 2014).

The Papaya Mosaic virus (PapMV) is a member of the Potexvirus genus and the family Alfaflexiviridae (Mishra *et al.*, 2016). It was first reported in Mexico in 2001 (Noa-Carranza *et al.*, 2006). Comparisons of protein coat of strains from Canada with strains from China showed 98% similarity (Sit *et al.*, 1989). However, comparisons between strains from China and strains from Mexico showed 73% similarity (Tennant *et al.*, 2007), whereas in Mexico strains of that virus showed similarity higher than 91% (Noa-Carranza *et al.*, 2006).

In general, it seems that the genetic variability of viruses PRSV-P and PapMV makes it necessary to use isolates from each region for genetic

indicaron la formación de subgrupos genéticos en función de la región geográfica de colecta; es decir, la similitud genética es mayor entre aislamientos procedentes de regiones vecinas. No obstante, al incluir información genética del GenBank de virus de otros países se determinaron dos grupos, con una similitud genética máxima de 86%; el primero lo conformaron virus de India, Hawaii, México, Venezuela, Cuba y Brasil. El segundo grupo incluyó a los virus de China, Taiwán, Tailandia, Corea del sur y Malasia (Rodríguez *et al.*, 2014).

El virus del mosaico de la papaya (PapMV) es miembro del género Potexvirus y de la familia Alfaflexiviridae (Mishra *et al.*, 2016). El primer reporte de su presencia en México fue en 2001 (Noa-Carranza *et al.*, 2006). Al comparar la proteína de la cubierta de las cepas de Canadá con las cepas de China la similitud es del 98% (Sit *et al.*, 1989); sin embargo, al comparar cepas provenientes de China con las de México la similitud ha sido del 73% (Tennant *et al.*, 2007), mientras que en México las cepas de ese virus presentan similitud mayor al 91% (Noa-Carranza *et al.*, 2006).

En forma general, se percibe que la variabilidad genética de los virus PRSV-P y PapMV, dan lugar a la necesidad de usar los aislamientos de cada región para eventos de transformación genética, generación de virus atenuados o desarrollo de esquemas de selección convencional de materiales genéticos de papaya por tolerancia a la virosis. Ambos están presentes en las diversas regiones ecológicas de México (Figura 1).

### Síntomas ocasionados por PRSV-P Y PapMV

Las plantas infectadas de PRSV-P se caracterizan por presentar mosaico, deformación foliar, amarillamiento o clorosis (Figura 2), achaparramiento, manchas anilladas en las frutas, manchas de mosaico; además de bandas oleosas y acuosas en el

transformation events, to create attenuated viruses or develop conventional schemes for selecting papaya genetic materials for virus tolerance. Both are present in diverse ecological regions of Mexico (Figure 1).

### Symptoms caused by PRSV-P AND PapMV

Characteristic symptoms of PRSV-P virus-infected plants include mosaic, leaf deformation, yellowing or chlorosis (Figure 2), stunting, ring spots on fruit, mosaic spots, and oil and water-soaked bands on petioles and the upper part of the stem. Infected plants develop abnormally, are smaller and have low vigor and less production and commercial quality (Kumar *et al.*, 2014). Changes observed in mass accumulation in PRSV-P virus infected plants are associated with a decrease in the photosynthesis rate and an increase in the respiration rate (Marler *et al.*, 1993).

Symptoms of PapMV infected plants include mottling of young leaves, chlorosis of veins and leaf lamina curved towards the underside (Figure 2); also, infected plants are shorter and have small leaves (Taylor, 2001). However, a co-infection by both viruses produces apical leaf necrosis, twisting, mottling and mosaic (Noa-Carranza *et al.*, 2006).

The presence and severity of symptoms produced by both viruses depend on diverse environmental factors that, when present, can increase or mitigate the severity of the infection. The susceptibility of plantlets inoculated with PRSV-P increases when they are subjected to short periods of darkness because the carbohydrate content in leaves decreases, which may interfere with the establishment of the virus in the cells. Temperature is also crucial for disease development. According to Cabrera *et al.* (2010), when temperatures are higher than 40 °C, the viral accumulation decreases; the same occurs when

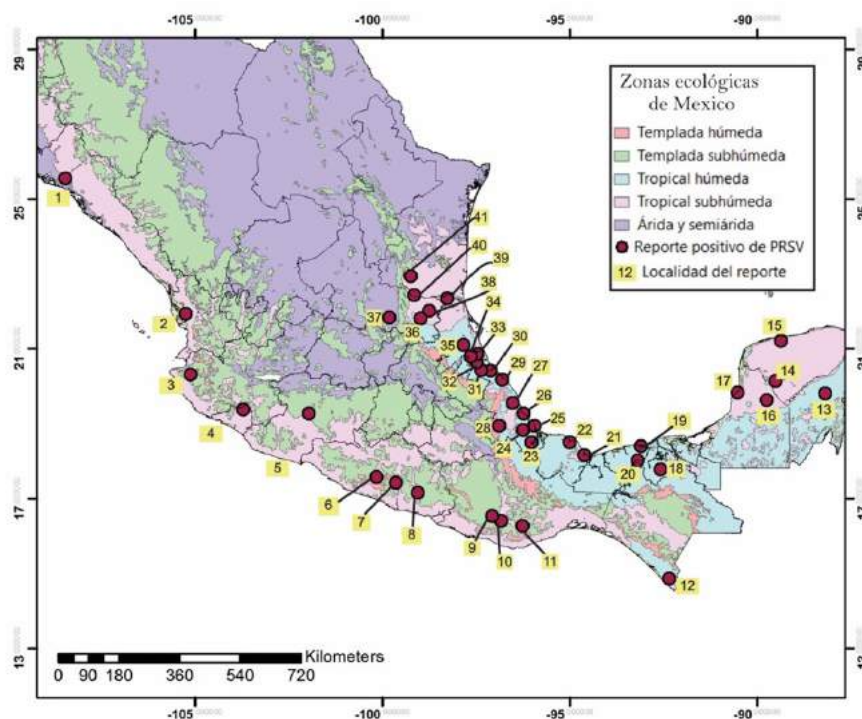


Figura 1. Distribución de los virus PRSV y PapMV en México. Elaboración propia de acuerdo al estudio de plantas con virosis, en 41 localidades, realizado por Noa-Carranza *et al.* (2006).

Figure 1. Distribution of PRSV and PapMV in Mexico. Developed by the authors based on a study on virus-infected plants conducted by Noa-Carranza *et al.* (2006) in 41 locations.

peciolo y en la parte superior del tallo. Las plantas infectadas presentan desarrollo anormal, menor tamaño, poco vigor y menor producción y calidad comercial (Kumar *et al.*, 2014). Los cambios observados en la acumulación de biomasa en las plantas infectadas con PRSV-P se asocian a la reducción de la tasa de fotosíntesis y al incremento de tasa de respiración (Marler *et al.*, 1993).

Los síntomas en las plantas infectadas por PapMV expresan un moteado en hojas jóvenes, aclaramiento de venas y curvatura de la lámina foliar hacia el envés (Figura 2); además, las plantas infectadas poseen porte bajo y hojas pequeñas (Taylor, 2001). Sin embargo, con la co-infección de ambos virus se observan síntomas foliares de

temperatures are lower than 20 °C. However, when room temperature ranges between 26 °C and 31 °C, the viral accumulation and expression of symptoms reaches its maximum level. This could be because the defense mechanism of silencing regulated by ARN can be easily suppressed by the environmental temperature (Mangrauthia *et al.*, 2009).

### Strategies for managing viral infections

Management strategies for diseases associated with virus infections include using virus-free propagules, removing plants with early infections, establishment of planting dates, control and study of vector aphid populations, transmission



**Figura 2.** Síntomas ocasionados por PRSV-P y PapMV en una hoja de *Carica papaya* L. variedad Maradol. A) Hoja con síntomas de PRSV-P en fase intermedia. B) Hoja con síntomas de PRSV en fase avanzada. C) Hoja con síntomas de PapMV en fase intermedia. D) Hoja con síntomas de PapMV en fase avanzada. Tapachula, Chiapas, México, 2016.  
**Figure 2.** Symptoms produced by PRSV-P and PapMV in a leaf of *Carica papaya* L. Maradol variety. A) Leaf showing symptoms of PRSV-P at intermediate phase. B) Leaf showing PRSV symptoms at advanced phase. C) Leaf showing symptoms of PapMV at intermediate phase. D) Leaf showing symptoms of PapMV at advanced phase. Tapachula, Chiapas, Mexico, 2016.

necrosis apical, torsión, moteado y mosaico (Noa-Carranza *et al.*, 2006).

La presencia y severidad de los síntomas debido a ambos virus depende de diversos factores ambientales que, en caso de presentarse, pueden aumentar o atenuar la severidad. Según Kassanis (2008), la susceptibilidad de plántulas inoculadas con PRSV-P aumenta si se someten a periodos cortos de oscuridad, debido al decremento del contenido de carbohidratos en la hoja, los cuales pueden interferir con el establecimiento del virus en

interferencia by aphids (plant barriers), mineral oil application, cross protection, genetic improvement for resistance, development of transgenic plants and quarantine practices (Villegas, 2001; Rivas-Valencia *et al.*, 2003; 2008; Subramanya and Zitter, 2014).

The most common strategy for controlling vector aphids is insecticide spraying. However, it seems possible to develop variants resistant to specific molecules such as neonicotinoids (Koo *et al.*, 2014). For this reason, the populations

las células. Así mismo, la temperatura se considera determinante para el desarrollo de la enfermedad. De acuerdo con Cabrera *et al.* (2010), con temperaturas superiores a 40 °C la acumulación viral disminuye, lo mismo ocurre en temperaturas inferiores a 20 °C; pero con la oscilación de la temperatura del ambiente entre 26 °C y 31 °C la acumulación viral y expresión de los síntomas alcanza un nivel máximo. Esto podría deberse a que el mecanismo de defensa de silenciamiento regulado por ARN puede suprimirse fácilmente por la temperatura ambiental (Mangrauthia *et al.*, 2009).

### Estrategias de manejo de la virosis

Entre las estrategias de manejo de enfermedades relacionadas con virus están: uso de propagulos libres de virus, eliminación de plantas con infecciones tempranas, determinación de fechas de siembra, control y estudio de poblaciones de áfidos vectores, interferencia de la transmisión por áfidos (barreras vegetales), aplicación de aceites minerales, protección cruzada, mejoramiento genético por resistencia, desarrollo de plantas transgénicas y prácticas cuarentenarias (Villegas, 2001; Rivas-Valencia *et al.*, 2003; 2008; Subramanya y Zitter, 2014).

La estrategia más común de control de áfidos vectores es la aspersión de insecticidas; sin embargo, es latente la posibilidad de desarrollar variantes resistentes a determinadas moléculas como los neonicotinoides (Koo *et al.*, 2014); por tanto, la dinámica de las poblaciones se considera importante en los análisis de incidencia de la enfermedad en plantaciones de papaya. Como ejemplo, Mora-Aguilera *et al.* (1996) indican que la localidad y fecha de trasplante (en febrero, abril o junio) son factores agronómicos importantes para coincidir con la menor incidencia de plantas infectadas, en la región central del estado de Veracruz, México.

dynamics is important in disease incidence analyses in papaya plantations. For example, Mora-Aguilera *et al.* (1996) state that the transplanting location and date (in February, April or June) are important agronomic factors to make them coincide with a lower incidence of infected plants in the central region of the state of Veracruz, Mexico.

Cross protection involves the use of attenuated virus to infect the plant and activate its genic silencing mechanism before it becomes infected by virulent strains (Fermin *et al.*, 2010). In Taiwan, Thailand and Hawaii, two attenuated isolates have been used in papaya production: PRSV-P HA 5-1 and PRSV-P HA 6-1. Although, these isolates do not provide total protection, papaya growers obtain acceptable yields consistently and predictably (Subramanya and Zitter, 2014).

### Development of transgenic papaya

There are three strategies to produce papaya resistant to PRSV-P (Villegas, 2001): 1) interspecific crosses aimed at developing a moderate-tolerant variety to be used as a genetic source; 2) interspecific crosses between *C. papaya* and its resistant wild relatives (such as *Vasconcellea cauliflora*, *V. quercifolia* and *V. pubescens*) to develop resistant hybrids; and 3) using genetic engineering to obtain resistance by transferring the gene of the virus capsid to papaya grown and develop transgenic papaya.

In 1981, Hawaii's papaya improvement program implemented the use of biotechnological tools such as: *in vitro* tissue culture for micropropagation of lines, rescue of embryos of interspecific crosses and genetic engineering (Villegas, 2001). Papaya was conceived to be transgenic by inserting the gene that encodes the protein coat of the PRSV virus HA 5-1 strain in the papaya genome. Later, tests were



La protección cruzada involucra la infección de la planta con virus atenuados para activar mecanismos de silenciamiento génico en la planta, antes de que sea infectada por cepas virulentas (Fermin *et al.*, 2010). En el cultivo de papaya en Taiwán, Tailandia y Hawaii se han usado dos aislamientos atenuados: PRSV-P HA 5-1 y PRSV-P HA 6-1. Estos no generan una protección absoluta pero los productores obtienen un rendimiento aceptable, de forma consistente y más predecible (Subramanya y Zitter, 2014).

### Desarrollo de papaya transgénica

Se han desarrollado tres estrategias para generar papayas resistentes al PRSV-P (Villegas, 2001): 1) cruza intraespecíficas para desarrollar una variedad con tolerancia moderada y utilizarla como fuente de genes; 2) cruza inter-específicas de *C. papaya* con los parientes silvestres resistentes (como *Vasconcellea cauliflora*, *V. quercifolia* y *V. pubescens*) y así desarrollar híbridos resistentes; y 3) obtener resistencia transfiriendo el gen de la cápside viral, mediante técnicas de ingeniería genética, a la papaya cultivada y así obtener una papaya transgénica.

El programa de mejoramiento de papaya de Hawaii, en 1981, se suplementó con herramientas biotecnológicas tales como: el cultivo de tejidos *in vitro* para la micropropagación de líneas, el rescate de embriones de cruza interespecíficas y la ingeniería genética (Villegas, 2001). Se concibió la papaya transgénica insertando el gen que codifica la cubierta proteínica del virus PRSV-P cepa HA 5-1 en el genoma de la papaya. Luego se probaron en campo, inoculándolas mecánicamente y se indujo la infección con el pulgón *Aphis* spp. El 95% de los individuos evaluados presentaron resistencia. No obstante, el transgen solo fue efectivo para proteger la papaya contra el virus local, pero no contra el

conducted in the field using mechanical inoculation to induce infection with aphids, finally 95% of the evaluated individuals showed resistance. However, the transgene was only efficient in protecting papaya against the local virus but not against PRSV from Taiwan, Thailand and Mexico (Gonsalves, 2006). These results confirmed that transgenesis requires a compatibility level higher than 98% between the virus and the transgene, and that the diversity of PRSV-P strains in the world's ecological niches limits their use (Gonsalves, 1998).

On the other hand, Davis and Ying (2004) transformed papaya lines using genes of the protein coat of PRSV-P H1K isolate from Florida. It should be noted that, after transformation, the percentage of susceptible plants was associated with the molecular architecture of the transgene used for transformation, the number of copies of the transgene present in the tissue and the effect of the genetic background on the varieties crossed with transgenic lines.

Currently, in Hawaii, over 70% of the area devoted to papaya cultivation corresponds to the transgenic hybrids SunUp and Rainbow (Azad *et al.*, 2014). Due to this tendency, countries like Jamaica, Venezuela and Thailand created their own technology to develop genetic materials resistant to PRSV-P endemic strains. In recent years, transgenic papaya has been established in Australia, Jamaica, Venezuela, Vietnam, Thailand, Taiwan and the Philippines (Fermin *et al.*, 2010).

In Mexico, there are legal restrictions for the establishment of commercial transgenic papaya plantations, as stated in the Norma Oficial Mexicana NOM-056-FITO-1995. Between 1995 and 2015, COFEPRIS evaluated food safety and authorized 146 events of genetically modified products but did not include papaya (COFEPRIS, 2015). This is a measure to protect plant centers of origin and domestication, as is the case of papaya in Mexico.

PRSV-P procedente de Taiwán, Tailandia y México (Gonsalves, 2006). Esto corroboró que la transgénesis requiere que la compatibilidad entre el virus y el transgen sea mayor a 98%, y a la vez que la diversidad de cepas de PRSV-P en los nichos ecológicos del mundo limita su uso (Gonsalves, 1998).

Por otra parte, Davis y Ying (2004) transformaron líneas de papaya con genes de la proteína de la cápside del PRSV-P, aislamiento H1K, de Florida. Se destaca que el porcentaje de plantas susceptibles, después de la transformación genética, estuvo relacionado con la arquitectura molecular del transgen usado en la transformación, el número de copias del transgen presente en el tejido, y el efecto del fondo genético de las variedades cruzadas con las líneas transgénicas.

En Hawaii, actualmente, más del 70% de la superficie dedicada al cultivo de la papaya corresponde a híbridos transgénicos SunUp y Rainbow (Azad *et al.*, 2014). Por esta tendencia, algunos países como Jamaica, Venezuela y Tailandia desarrollaron tecnología propia, con el fin de generar materiales genéticos resistentes a las cepas endémicas de PRSV-P. En los últimos años la papaya transgénica se ha establecido en Australia, Jamaica, Venezuela, Vietnam, Tailandia, Taiwán y Filipinas (Fermin *et al.*, 2010).

En el caso de México, existen limitantes legales para el establecimiento de plantaciones comerciales con papayas transgénicas, lo cual está establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-056-FITO-1995. La COFEPRIS, entre 1995-2015, ha evaluado la inocuidad alimentaria y autorizado 146 eventos de productos genéticamente modificados, dentro de los cuales no se incluye al cultivo de papaya (COFEPRIS, 2015). Esto es debido a la protección de los centros de origen y domesticación de plantas, como es el caso de la papaya en México.

### Introgression of resistance genes in virus

Gene introgression among species occurs naturally and has enhanced genetic diversity through cross-pollination (Droogenbroeck *et al.*, 2006). This also allows the development of new varieties because disease resistance genes from wild species can be introgressed into important commercial varieties (Dinesh *et al.*, 2013).

Interspecific hybridization is the result of a long-term genetic strategy for controlling viral infections that consists in making artificial crosses between domesticated papaya (*C. papaya* L.) and other species of the *Vasconcellea* genus that is a member of the family *Caricaceae* (Drew, 2014).

There are 21 *Vasconcellea* species (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014) in Central and South America, and this will allow us to evaluate genetic material with potential resistance to native viruses that could be used to develop resistant populations. However, in this process, it is important to consider both the presence of prezygotic and postzygotic barriers to produce useful hybrid seeds (poor pollen germination and sterile seed development, due to embryo and ovule abortion) (Veena and Dinesh, 2013), and the genetic distances among species in crossing schemes (Sharma and Tripathi, 2016). For this reason, introgression requires identifying species and varieties that are resistant to PRSV-P and also compatible in artificial crosses, to serve as parents.

In Mexico, the importance of evaluating wild relatives of *C. papaya* as sources of genetic resistance to PRSV-P and PapMV was recognized since 1978. At that time, *Vasconcellea cauliflora* (Vc), *V. pubescens*, *V. stipulata* and *V. candicans* were reported as being resistant to papaya ringspot virus (PRSV) and Vc is the only one found in Mexico. However, crosses between *C. papaya* and

### Introgresión de genes de resistencia a virus

La introgresión de genes entre especies ocurre de manera natural y ha enriquecido la diversidad genética a través de la polinización cruzada (Drogenbroeck *et al.*, 2006). Inclusive, esto facilita el desarrollo de nuevas variedades porque es factible la introgresión de genes de resistencia a enfermedades, a variedades importantes comercialmente, a partir de las especies silvestres (Dinesh *et al.*, 2013).

La hibridación interespecífica ha resultado una estrategia de control genético de la virosis de largo plazo, la cual consiste en cruzar artificialmente la papaya domesticada (*C. papaya* L.) con otras especies del género *Vasconcellea* que forma parte de la familia *Caricaceae* (Drew, 2014).

En América Central y Sur existen 21 especies silvestres de *Vasconcellea* (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014). Esto permitiría escudriñar este material genético, potencialmente resistente a virus nativos, para usarse en la generación de poblaciones resistentes. No obstante, en ese proceso es importante considerar la presencia de barreras precigóticas y postcigóticas para la producción de semillas híbridas funcionales: fallas en la germinación del polen y el desarrollo de semillas estériles debido al aborto de embriones y óvulos (Veena y Dinesh, 2013); pero también es importante considerar las distancias genéticas entre las especies en el esquema de cruzamiento (Sharma y Tripathi, 2016). Por lo anterior, la introgresión requiere la identificación de especies y variedades que presenten resistencia a virus PRSV-P y que sean compatibles en sus cruas artificiales para usarse como progenitores.

En México, desde 1978 se manifestó la relevancia de evaluar los parientes silvestres de la *C. papaya* como fuentes resistencia genética a los virus PRSV-P y PapMV. En aquel tiempo, se reportó que *Vasconcellea cauliflora* (*Vc*), *V. pubescens*, *V.*

*Vasconcellea* spp. exhibited compatibility barriers, such as development of F<sub>1</sub> seed without embryo and F<sub>1</sub> seed without endosperm (Mosqueda, 1978). When parents show low compatibility, a protocol is needed to rescue immature hybrid embryos using *in vitro* tissue culture techniques (Azad *et al.*, 2014).

Some *Vasconcellea* species are resistant to certain PRSV-P strains; for example, *V. quercifolia* is resistant to virus strains from Florida, Hawaii and Australia but susceptible to isolates from Venezuela; *V. cauliflora* is considered to be resistant to strains from Maracay (Venezuela), Mexico, Australia and India but susceptible to isolates from Florida and some from Venezuela; other species are resistant: *V. pubescens*, *V. stipulata*, *V. heilbornii* and *V. candicans* (Horovitz and Jimenez, 1967; Sharma and Tripathi, 2016). Results from these experiments showed resistance variability in terms of the geographic origin of PRSV-P.

Horovitz and Jimenez (1967) made interspecific crosses and found some hybrids resistant to PRSV-P. The authors also stated that a dominant gene is responsible for resistance to virus infections. In crosses between papaya and *V. quercifolia* several fertile hybrids have been obtained (Villegas, 2001). In 2011, segregant populations were obtained from four backcrosses (Backcross: BC<sub>1</sub> to BC<sub>4</sub>) between *V. quercifolia* and *C. papaya* lines. After mechanical inoculation with PRSV-P isolated in the Philippines, plantlets without symptoms (72.3% to 96.1%) under greenhouse conditions were recorded. After 18 months in the field, plants from the BC<sub>4</sub> backcross were analyzed using the ELISA technique but only 66% of them were resistant (Siar *et al.*, 2011). In BC<sub>3</sub> plants, the ratio of resistant: susceptible segregants was 3:1, whereas in BC<sub>4</sub> plants two types of ratio were observed: 2:1 and 4:1. These results indicated that the resistance to virus infection is polygenic (Alamery and Drew, 2014). Although in combinations of *C. papaya* x

*stipulata* y *V. candicans* son especies resistentes al virus de la mancha anular, siendo *Vc* la única que se puede localizar en México. No obstante, las cruizas entre *C. papaya* y *Vasconcellea* spp. presentaron barreras de la compatibilidad, como el desarrollo de semillas  $F_1$  sin embrión y semillas  $F_1$  sin endospermo (Mosqueda, 1978). En el caso de que los parentales tengan baja compatibilidad, es necesario contar con un protocolo de rescate de embriones híbridos inmaduros, mediante técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* (Azad *et al.*, 2014).

Algunas especies de *Vasconcellea* son resistentes a ciertas cepas de PRSV-P, e. g. *V. quercifolia* es resistente a cepas del virus originarias de Florida, Hawaii y Australia, pero presenta susceptibilidad a los aislamientos de Venezuela; *V. cauliflora* se considera resistente a cepas originarias de Maracay (Venezuela), México, Australia e India, no obstante, es susceptible a los aislamientos de Florida y también a algunos de Venezuela; otras especies resistentes son *V. pubescens*, *V. stipulata*, *V. heilbornii* y *V. candicans* (Horovitz y Jimenez, 1967; Sharma y Tripathi, 2016). Estos resultados experimentales muestran la variabilidad de la resistencia en función del origen geográfico del virus PRSV-P.

Horovitz y Jimenez (1967) realizaron cruza-mientos interespecíficos y algunos de los híbridos resultaron resistentes al PRSV-P; además postularon que es un gen dominante el responsable de la resistencia a la virosis. También en las cruizas de papaya con *V. quercifolia* se han obtenido varios híbridos fértiles (Villegas, 2001). Adicionalmente, en 2011 se obtuvieron poblaciones segregantes mediante cuatro retrocruzas (Backcross:  $BC_1$  a  $BC_4$ ) entre *V. quercifolia* y líneas de *C. papaya*. Después de inocularlas mecánicamente con PRSV-P, aislado en Filipinas, se registraron de 72.3% a 96.1% de plántulas sin síntomas en condiciones de invernadero. Después de 18 meses de desarrollo en campo, las plantas de la  $BC_4$  se analizaron con la técnica de

*V. pubescens* resistance to PRSV-P was also found, their progeny was sterile to continue a conventional improvement scheme. For this reason, a bridge has been proposed to transfer resistance genes through *V. pubescens* x *V. parviflora* crosses, and then make crosses with *C. papaya* (Drew, 2014). On the other hand, Kumar and Tripathi (2016) proposed another transference bridge by intercrossing *V. cundinamarcensis* x *V. parviflora*, and then pollinate  $F_1$  individuals with *C. papaya* to obtain hybrids resistant to virus infections.

Genetic studies using an  $F_2$  generation from *V. pubescens* (resistant) x *V. parviflora* (susceptible) crosses showed a STK (serine threonine protein kinase marker gene) associated with resistance to PRSV-P. Based on this result, Haireen and Drew (2014) cloned the STK gene and observed that its genomic sequence is similar to that of *Carica papaya* (known as: CP\_STK). They also found an equivalent gene in *V. pubescens* (VP\_STK2). When they compared their genomic sequences, they noted structural differences and, for this reason, the protein products may show a differentiated role, a fact that may influence the species susceptibility or resistance to the virus.

### Intergeneric hybrids with *Vasconcellea cauliflora*

Magdalita *et al.* (1997) made *C. papaya* x *Vc* crosses and rescued *in vitro*  $F_1$  embryos to develop hybrid individuals. The hybrid plants were artificially inoculated with two PRSV-P isolates from Australia. From 114 plants inoculated in the greenhouse, 22 survived and 100% did not develop virus infection symptoms. In another lot of 20 hybrid plants established in the open field, 12 survived and none of them developed virus infection, a fact that was confirmed using the ELISA technique.

There are currently protocols for *in vitro* tissue culture to rescue embryos resulting from manual

ELISA y solo el 66% de ellas se consideraron resistentes (Siar *et al.*, 2011). En la BC<sub>3</sub> la proporción de segregantes resistentes: susceptibles fue de 3:1; por el contrario, en la BC<sub>4</sub> se detectaron dos tipos de proporciones: 2:1 y 4:1, información que indicó que la resistencia a la virosis es de tipo poligénica (Alamery y Drew, 2014).

En la combinación de *C. papaya* x *V. pubescens* también se ha encontrado resistencia al PRSV-P, pero la descendencia ha resultado estéril para continuar un esquema de mejoramiento convencional. Por ello, se ha planteado un puente para la transferencia de genes de resistencia al cruzar *V. pubescens* x *V. parviflora* y luego con *C. papaya* (Drew, 2014). Por otro lado, Kumar y Tripathi (2016) plantean otro puente de transferencia al entrecruzar *V. cundinamarcensis* x *V. parviflora*, luego los individuos F<sub>1</sub> se polinizan con *C. papaya* y así obtener híbridos resistentes a la virosis.

En estudios genéticos de la generación F<sub>2</sub>, a partir de la cruce de *V. pubescens* (resistente) x *V. parviflora* (susceptible) encontraron un gene marcador, STK (serine threonine protein kinase, por sus siglas en inglés), relacionado a la resistencia al PRSV-P. Con base en eso, Haireen y Drew (2014) clonaron el gene STK y descifraron que su secuencia genómica es equivalente al de *Carica papaya* (denominado: CP\_STK). También determinaron un gen equivalente en *V. pubescens* (VP\_STK2). Al compararse las secuencias genómicas evidenciaron diferencias estructurales y por lo tanto los productos proteicos presentarían una función diferenciada, lo cual estaría influyendo en la susceptibilidad o resistencia de las especies al virus.

### **Híbridos intergenéricos con *Vasconcellea cauliflora***

Magdalita *et al.* (1997) realizaron cruzamientos de *C. papaya* x *Vc* y los embriones F<sub>1</sub> se rescataron

pollination of papaya with *Vc* pollen. It has been stated that the optimum date to extract embryos from immature seeds is 90 days after pollination (Azad *et al.*, 2014; Vegas *et al.*, 2003).

Another alternative for obtaining intergeneric embryos would be to break the compatibility barriers present in artificial crosses between papaya and *Vc*. For this purpose, Dinesh *et al.* (2007) applied a 5% sucrose solution to flower stigmas before manual pollination and obtained hybrid seeds in crosses between Surya and Pusa Dwarf papaya varieties x *Vc*. 71.1% of pollinated flowers bore fruit and produced 13.7 F<sub>1</sub> seeds in average. Using ISSR molecular markers, the authors confirmed that the seeds were interspecific hybrids. Later, Dinesh *et al.* (2013) created a selection scheme making crosses between *C. papaya* var. Arka Surya x *Vc* (Figure 3) and achieved encouraging results (Yanthan *et al.*, 2017).

Jayavalli *et al.* (2011, 2012) made crosses between *Vc* and 9 papaya varieties from India to which they also applied 5% sucrose solutions combined with calcium chloride and boron. From the total of pollinated flowers (n=1197), 25.7% bore fruits. Each fruit had 2.3 hybrid seeds in average, and from the total number of seeds, 58.1% germinated. F<sub>1</sub> plants performed well and were inoculated with PRSV-P; 23.6% did not develop viral symptoms, but the remaining percentage exhibited mosaic and deformation of merismatic leaves, so it was determined that Pusa Nanha x *Vc* was the best intergeneric hybrid.

Sudha *et al.* (2013) evaluated an F<sub>2</sub> generation of crosses between *Vc* and Pusa Nanha, CP50 and CO7 varieties. From 700 F<sub>2</sub> plants inoculated with PRSV-P, 46% of them did not show virus infection symptoms. Considering the number of days from the inoculation date to the appearance of symptoms, as well as their severity, the best F<sub>2</sub> family resulted from the cross between Pusa Nanha x *Vc*. Using an F<sub>3</sub> generation, Sudha *et al.* (2015)

*in vitro* para regenerar los individuos híbridos. Las plantas híbridas se inocularon artificialmente con dos aislamientos de PRSV-P de Australia. De 114 plantas inoculadas en invernadero, 22 sobrevivieron y el 100% no presentó síntomas de virosis. En otro lote de 20 plantas híbridas establecidas en campo abierto sobrevivieron 12 y todas estuvieron libres de virosis, lo cual se confirmó con la técnica de ELISA.

Actualmente existen protocolos de cultivo de tejidos *in vitro*, para rescatar los embriones resultantes de la polinización manual de la papaya con polen de *Vc*; se ha determinado que la fecha óptima para extraer los embriones de las semillas inmaduras deberá ser a los 90 días posteriores a la polinización (Azad *et al.*, 2014; Vegas *et al.*, 2003).

Otra alternativa de obtención de híbridos intergenéricos es romper las barreras de compatibilidad presentes en las cruza artificiales de papaya con *Vc*. Con tal fin, Dinesh *et al.* (2007) aplicaron una solución de sacarosa al 5% en los estigmas florales antes de la polinización manual; con ello, lograron obtener semillas híbridas al cruzar variedades de papaya Surya y Pusa Dwarf con *Vc*; el 71.1% de las flores polinizadas produjeron frutos y desarrollaron 13.7 semillas  $F_1$  en promedio. La confirmación de que las semillas eran híbridos interespecíficos se realizó a través del uso de marcadores moleculares tipo ISSR. Posteriormente, Dinesh *et al.* (2013), generaron un esquema de selección a partir de la cruza *C. papaya* var. Arka Surya x *Vc* (Figura 3), con avances alentadores (Yanthan *et al.*, 2017).

Por su parte, Jayavalli *et al.* (2011, 2012) realizaron cruza de *Vc* con nueve variedades de papaya de la India; también aplicaron soluciones de sacarosa al 5% y en combinación con cloruro de Calcio y Boro. Del total de flores polinizadas (n=1197), el 25.7% desarrollaron frutas. Cada fruta tuvo 2.3 semillas híbridas en promedio y del total de semillas germinaron el 58.1%. Estas plantas  $F_1$  desarrollaron

evaluado 1,778  $F_3$  plantas inoculadas with PRSV-P and found that 30.7% did not show virus infection symptoms after 27 days; therefore, according to the severity scale, they were considered resistant; the remaining percentage of plants were classified as susceptible and highly susceptible. When the resistant plants were taken to the greenhouse and evaluated up to 270 after inoculation, plants from the cross between Pusa Nanha x *Vc* were found to be resistant- and intermediate resistant.

Jayavalli *et al.* (2015) also studied an  $F_2$  generation from crosses CO7 x *Vc*, Pusa Nanha x *Vc* y CP50 x *Vc*. For this purpose, they inoculated 683 plantlets of the three crosses with PRSV-P, and found that 12.8% did not show infection symptoms, but in a virus detection trial using DAS-ELISA they obtained low absorbance values (< 0.24). In a CO7 x *Vc* cross, they obtained resistant plants in a 15:1 ratio (susceptible:resistant), while in the other two crosses (Pusa Nanha x *Vc* and CP50 x *Vc*), the resistant plants segregated in a 13:3 ratio.

The genetic structure proposed by Jayavalli *et al.* (2015), where they suggested that the presence of two dominant genes may explain such ratio of susceptible individuals, is shown in Table 1. They pointed out that there was no segregation in a 3:1 ratio as in the Mendelian inheritance. Also, the ratios observed indicate that there are multiple alleles in both species that when interacting produce genetic combinations associated with the PRSV-P virus.

## CONCLUSIONS

Studies on virus resistance have been mainly focused on PRSV-P due to its capacity to reduce papaya commercial yields. PapMV had not been fully addressed because of its low economic impact in papaya crops, but based on the evidence of co-infection and its effects on the severity of symptoms

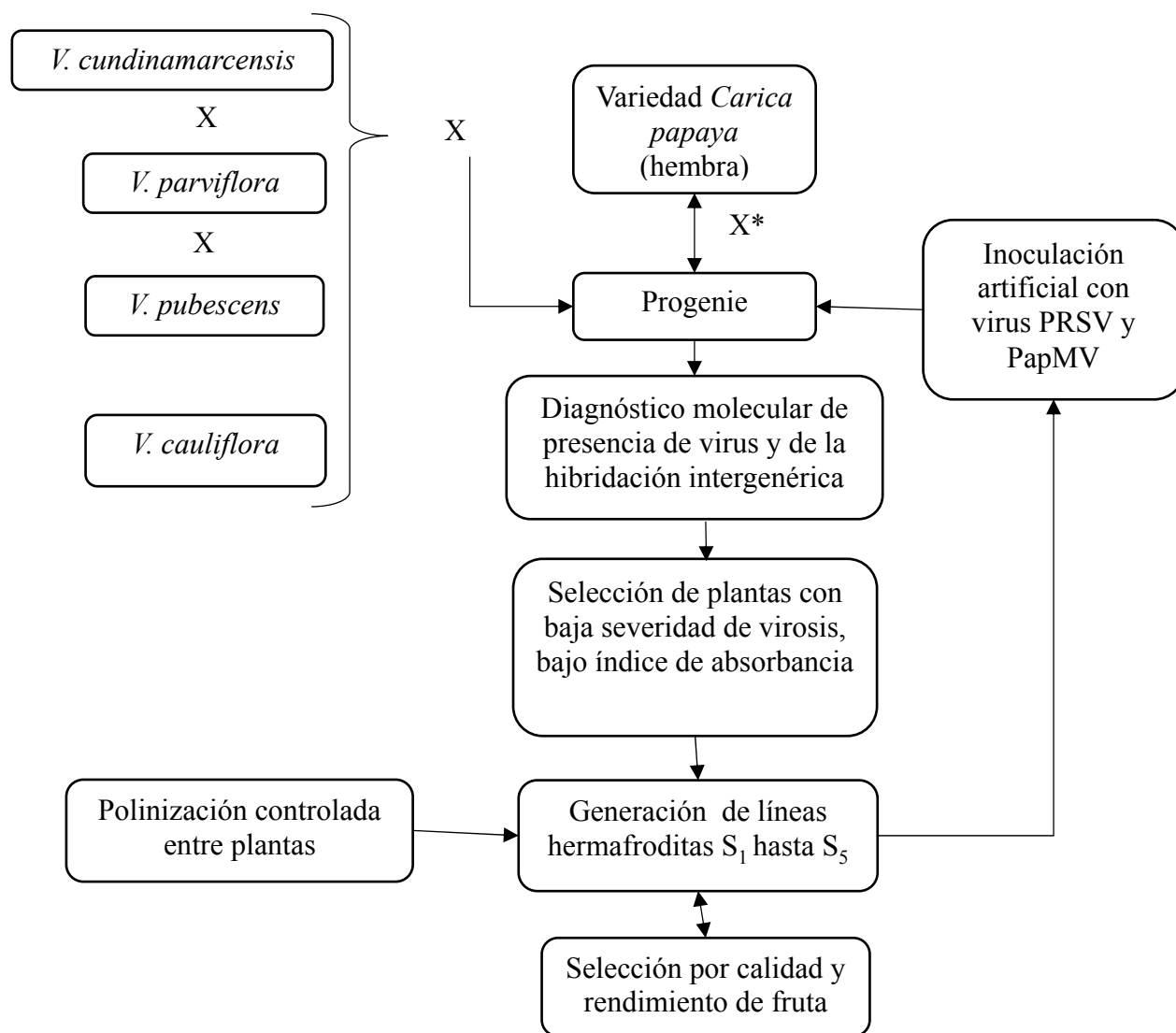


Figura 3. Esquema de cruces entre especies de *Vasconcellea* con *Carica papaya*, para desarrollar líneas tolerantes a la virosis. Importante el uso de marcadores de ADN para confirmar los híbridos intergenéricos y pruebas de ELISA para estimar el nivel de carga viral en el tejido de las plantas. Elaborado con base en Dinesh *et al.* (2013) y Kumar y Tripathi (2016). X= Cruza, X\*= Retrocruza.

Figure 3. Scheme of crosses between *Vasconcellea* and *Carica papaya* species to develop lines tolerant to virus infections. It is important to use DNA markers to confirm intergeneric hybrids, and ELISA tests to estimate the level of viral charge in the tissue of the plants. Based on Dinesh *et al.* (2013) and Kumar and Tripathi (2016). X= Cross, X\*= Backcross.

y se inocularon artificialmente con PRSV-P, de las cuales el 23.6% no mostró síntomas de virus, pero el restante porcentaje mostró mosaico y deformación en las hojas meristemáticas, con lo cual determinaron que el mejor híbrido intergenérico fue Pusa Nanha x *Vc*.

and damage to papaya crops, it is important to integrate PapMV in studies on virus resistance in Mexico.

Considering the importance of papaya crops and yield reductions attributable to PRSV-P and PapMV in Mexico, alternatives for developing

Así mismo, Sudha *et al.* (2013), evaluaron la generación F<sub>2</sub> de las cruzas de *Vc* con las variedades Pusa Nanha, CP50 y CO7; inocularon 700 plantas F<sub>2</sub> con PRSV-P, el 46% de ellas no mostró síntoma alguno de virosis. Considerando los días transcurridos a partir de la inoculación hasta la aparición de síntomas y la severidad de los mismos, la mejor familia F<sub>2</sub> procedió de la crusa Pusa Nanha x *Vc*. En la generación F<sub>3</sub>, evaluada por Sudha *et al.* (2015), se inocularon 1778 plantas con PRSV-P de las cuales el 30.7% no mostraron síntomas de virosis después de 27 días, y se consideraron resistentes de acuerdo con la escala de severidad; el porcentaje restante de plantas se clasificaron como susceptibles y altamente susceptibles. Al llevar las plantas resistentes a un invernadero y evaluarse hasta los 270 días después de la inoculación, aquellas plantas derivadas de la crusa Pusa Nanha x *Vc* fueron resistentes y medianamente resistentes.

La generación F<sub>2</sub> de las cruzas: CO7 x *Vc*, Pusa Nanha x *Vc* y CP50 x *Vc*, también fue estudiada por Jayavalli *et al.* (2015). Para ello inocularon 683 plántulas de las tres cruzas con PRSV-P, encontrándose que el 12.8% de ellas no presentaron síntomas y en el ensayo de detección de virus con la técnica DAS-ELISA tuvieron bajos valores de absorbancia (< 0.24). En la crusa CO7 x *Vc* se obtuvieron plantas resistentes en proporción 15:1 (susceptibles: resistentes), mientras que en las otras dos cruzas (Pusa Nanha x *Vc* y CP50 x *Vc*) las plantas resistentes segregaron en proporción 13:3.

La estructura genética propuesta por Jayavalli *et al.* (2015), mediante la cual dedujeron que son dos genes dominantes los que estarían explicando esa proporción de individuos susceptibles, se muestra en el Cuadro 1. Además, señalan que no hubo segregación en proporción 3:1 como ocurre en la herencia mendeliana. En adición, las proporciones observadas indican que hay múltiples alelos en ambas especies que, al interaccionar, dan lugar a

varieties resistant to these viruses are required. Given the restrictions on using transgenic papaya varieties, an alternative is genetic improvement by making crosses between *C. papaya* lines and species of the *Vasconcellea* genus as donors for resistance to viruses, especially *V. cauliflora* that is naturally distributed across Mexico. It gives also an opportunity to include this kind of research in a genetic improvement program that can meet the demand of non-transgenic resistant varieties, through direct crosses or establishing a bridge to transfer virus-resistance genes using the interspecific triple cross among *V. cundinamaricensis* x *V. parviflora* x *C. papaya* to develop virus-resistant hybrids.

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

combinaciones genéticas relacionadas con la resistencia al virus PRSV-P.

CONCLUSIONES

Los estudios de resistencia a virus se han centrado principalmente en el PRSV-P, debido a su efecto en reducir el rendimiento comercial del fruto. Mientras que PapMV no ha tenido gran auge en este tipo de investigaciones por su bajo impacto económico en el cultivo; sin embargo, con la evidencia de la co-infección y sus efectos en la severidad de los síntomas y daños, es importante incorporar a PapMV en el estudio de resistencia a virosis en México.

Considerando la importancia del cultivo de papaya y la disminución en el rendimiento atribuido al PRSV-P y PapMV en México, se requieren de alternativas para el desarrollo de variedades resistentes a estos virus. Dadas las restricciones del

Cuadro 1. Estructura genética de variedades de *C. papaya*, de *V. cauliflora* y de sus poblaciones segregantes en función de la reacción al virus PRSV.

Table 1. Genetic structure of *C. papaya* and *V. cauliflora* varieties and of their segregant populations in terms of their reaction to PRSV.

| Parentales | <i>C. papaya</i> var. C07 | <i>V. cauliflora</i> | <i>C. papaya</i> vars. Pusa Nanha y CP50 | <i>V. cauliflora</i> |
|--|--|---|---|---|
| Genotipo de los parentales | S ₁ S ₁ S ₂ S ₂ | s ₁ s ₁ s ₂ s ₂ | S ₃ S ₃ s ₄ s ₄ | s ₃ s ₃ S ₄ S ₄ |
| | S ₁ –S ₁ – (9 susceptibles) | | S ₃ –S ₄ – (9 susceptibles) | |
| Genotipos en la generación F ₂ (proporción) | S ₁ –s ₂ s ₂ (3 susceptibles) | | S ₃ –s ₄ s ₄ (3 susceptibles) | |
| | s ₁ s ₁ S ₂ – (3 susceptibles) | | s ₃ s ₃ S ₄ – (3 resistentes) | |
| | s ₁ s ₁ s ₂ s ₂ (1 resistente) | | s ₃ s ₃ S ₄ S ₄ (1 susceptible) | |

Fuente: elaborado a partir de Jayavalli *et al.* (2015) / Source: Adapted from Jayavalli *et al.* (2015).

uso de variedades de papaya transgénica, se tiene la alternativa del mejoramiento genético a través del cruzamiento de líneas de *C. papaya* con especies del género *Vasconcellea* como donadoras de la resistencia a virus; en especial, *V. cauliflora* que se distribuye naturalmente en México. Además, es una oportunidad de insertar este tipo de investigaciones en un programa de mejoramiento genético que pueda atender la demanda de variedades resistentes no transgénicas, mediante cruza directa o estableciendo un puente de transferencia de genes de resistencia al virus al usar la cruza triple interespecífica: *V. cundinamarcensis* x *V. parviflora* x *C. papaya*, y de esta forma obtener híbridos resistentes a la virosis.

LITERATURA CITADA

- Abreu PMV, Gaspar CG, Buss DS, Ventura JA, Ferreira PCG, and Fernández PMB. 2014. *Carica papaya* microRNAs are responsive to papaya meaira virus infection. PLoS ONE 9(7): e103401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103401>
- Alamery S and Drew R. 2014. Studies on the genetics of PRSV-P resistance genes in intergeneric hybrids between *Carica papaya* and *Vasconcellea quercifolia*. Acta Horticulturae 1022: 55-61. DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1022.5
- Antunes CF and Renner SS. 2014. The phylogeny of the caricaceae. Pp:81-92. In: R. Ming and Moore PH (eds.). Genetics and Genomics of Papaya. Springer Science Business Media, New York, USA. 438p.
- Azad MAK, Amin L and Sidik NM. 2014. Gene technology for papaya ringspot virus disease management. The Scientific World Journal: 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/768038>.
- Bateson MF, Lines RE, Revill P, Chaleeprom W, Ha CV, Gibbs AJ and Dale JL. 2002. On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus papaya ringspot virus. Journal of General Virology 83:2575-2585. DOI:10.1099/0022-1317-83-10-2575
- Cabrera MD, Cruz MM y Portal VO. 2010. Efecto de la temperatura en la virulencia del virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P). Fitosanidad 14(2):123-125. Disponible en línea: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092010000200009
- Chávez-Calvillo G, Contreras-Paredes CA, Mora-Macias J, Noa-Carranza JC, Serrano-Rubio AA, Dinkova TD, Carrillo-Tripp M and Silva-Rosales L. 2016. Antagonism and synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in *Carica papaya* in determined by their order of infection. Virology 489:179-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.026>
- Chávez-Pesqueira M, Suárez-Montes P, Castillo G and Núñez-Farfán J. 2014. Habitat fragmentation threatens wild populations of *Carica papaya* (Caricaceae) in a lowland rainforest. American Journal of Botany 101(7):1092-1101. DOI:10.3732/ajb.1400051
- COFEPRIS, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2015. <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Cultivos.aspx>. Consulta: Noviembre de 2016.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Drew R, Kyndt T and Scheldeman X. 2014. *Vasconcellea* for Papaya Improvement. Pp:47-79. In: R Ming and Moore PH (eds.) Genetics and Genomics of Papaya. Springer Science Business Media, New York, USA. 438p.
- Davis MJ and Ying Z. 2004. Development of papaya breeding lines with transgenic resistance to papaya ringspot virus. Plant Disease 88:352-358. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.4.352>
- Dinesh MR, Rekha A, Ravishankar KV, Praveen KS and Santosh LC. 2007. Breaking the intergeneric crossing barrier

- in papaya using sucrose treatment. *Scientia Horticulturae* 114: 33–36. DOI:10.1016/j.scienta.2007.05.010
- Dinesh MR, Veena GL, Vasugi C, Krishna MR and Ravishankara KV. 2013. Intergeneric hybridization in papaya for 'PRSV' tolerance. *Scientia Horticulturae* 161: 357–360. DOI:10.1016/j.scienta.2013.07.009
- Drew R. 2014. The use of non-transgenic technologies for the development of papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya*. *Proc. Acta Horticulturae* 1022:22-29. DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1022.2
- Droogenbroeck BV, Kyndt T, Romeijn-Peeters E, Thuyné WV, Goetghebeur P, Romero-Motochi JP and Gheysen G. 2006. Evidence of natural hybridization and introgression between *Vasconcellea* species (Caricaceae) from Southern Ecuador revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Annals of Botany* 97:793-805. DOI:10.1093/aob/mcl038
- Fermin GA, Castro LT and Tennant PF. 2010. CP-Transgenic and non-transgenic approaches for the control of papaya ringspot: current situation and challenges. *Transgenic Plant Journal* 4 (Special Issue 1):1-15. Disponible en línea: [http://www.globalseiencebooks.info/Online/GSBOonline/images/2010/TPJ_4\(SI1\)/TPJ_4\(SI1\)1-15o.pdf](http://www.globalseiencebooks.info/Online/GSBOonline/images/2010/TPJ_4(SI1)/TPJ_4(SI1)1-15o.pdf)
- Gonsalves D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology* 36:415-437. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.415>
- Gonsalves D. 2006. Transgenic papaya: development, release, impact and challenges. *Advances in Virus Research* 67:317-354. DOI:10.1016/S0065-3527(06)67009-7
- Haireen MRR and Drew RA. 2014. Isolation and characterization of PRSV-P resistance genes in *Carica* and *Vasconcellea*. *International Journal of Plant Genomics* 5:145403. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/145403>
- Horovitz S y Jiménez H. 1967. Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en caricáceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agronomía Tropical* 17(4): 323-343.
- Jayavalli R, Balamohan TN, Manivannan N and Govindaraj M. 2011. Breaking the intergeneric hybridization barrier in *Carica papaya* and *Vasconcellea cauliflora*. *Scientia Horticulturae* 130:787-794. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.004>
- Jayavalli R, Balamohan TN, Manivannan N and Robin S. 2012. Analysis of papaya intergeneric hybrids for morphological traits. *Madras Agriculture Journal* 99 (4-6): 166-170. Disponible en línea: <https://www.cabdirec.org/cabdirec/abstract/20123213250>
- Jayavalli R, Balamohan TN, Manivannan N, Rabindran R, Paramaguru P and Robin R. 2015. Transmission of resistance to papaya ringspot virus (PRSV) in intergeneric populations of *Carica papaya* and *Vasconcellea cauliflora*. *Scientia Horticulturae* 187:10-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.020>
- Kassanis B. 2008. Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses. *Annals of Applied Biology* 39:358-363. DOI:10.1111/j.1744-7348.1952.tb01018.x
- Koo HN, Jeong-Jin An, Sang-Eun P, Ju-Il K and Gil-Hah K. 2014. Regional susceptibilities to 12 insecticides of melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and a point mutation associated with imidacloprid resistance. *Crop Protection* 55:91-97. DOI:10.1016/j.cropro.2013.09.010
- Kumar GR, Hohn T and Sharma P. 2014. Plant virus-host interaction. *Molecular approaches and viral evolution*. Pp:177-194. In: Gaur RK, Hohn T and Sharma P (eds.). *Papaya Ringspot Virus-P: Overcoming Limitations of Resistance Breeding in Carica papaya L.* Elsevier. USA. 408p.
- Kumar SS and Tripathi S. 2016. Resistance against papaya ringspot virus in *Vasconcellea* species: present and potential uses. Pp:215-230. In: Gaur RK, Petrov NM, Patil BL and Stoyanova MI (eds.). *Plant Viruses: Evolution and Management*. Springer Science Business Media, Singapore. 312p.
- Magdalita PM, Persley DM, Godwin ID, Drew RA and Adkins SW. 1997. Screening *C. papaya* x *C. cauliflora* hybrids for resistance to papaya ringspot virus -type P. *Plant Pathology* 46:837–841. DOI:10.1046/j.1365-3059.1997.d01-90.x
- Mangrauthia SK, Singh VPS, Jain RK, Praveen S. 2009. Ambient temperature perception in papaya for papaya ringspot virus interaction. *Virus Genes* 38:429-434. DOI:10.1007/s11262-009-0336-3
- Marler TE, Mickelbart MV and Quituga R. 1993. Papaya ringspot virus influences net gas exchange of papaya leaves. *HortScience* 28(4): 322-324. Disponible en línea: <http://hortsci.ashspubs.org/content/28/4/322.full.pdf>
- Mishra R, Kumar RG and Patil BL. 2015. Current knowledge of viruses infecting papaya and their transgenic management. Pp: 109-203. In: Gaur RK, Petrov NM, Patil BL and Stoyanova MI (eds.). *Plant viruses: Evolution and Management*. Springer Science Business Media, Singapore. 312 p.
- Mora-Aguilera G, Nieto-Ángel D, Campbell CL, Téliz D and García E. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86:70-78. DOI:10.1094/Phyto-86-70
- Mosqueda VR. 1978. Papayo, Piña y Guayabo. Pp:299-309. In: Cervantes ST (ed.). *Recursos Genéticos Disponibles a México*. Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C., Chapingo, México. 492p.
- Noa-Carranza JC, González-de-León D, Ruiz-Castro BS, Piñero D and Silva-Rosales L. 2006. Distribution of papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in papaya plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plan Disease* 90:1004-1011. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-1004>
- Rivas-Valencia P, Mora-Aguilera G, Téliz-Ortiz D y Mora-Aguilera A. 2003. Influencia de variedades y densidades de plantación de papayo (*Carica papaya* L.) sobre las epidemias de mancha anular. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(2):109-116. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221203>
- Rivas-Valencia P, Mora-Aguilera G, Téliz-Ortiz D y Mora-Aguilera A. 2008. Evaluación de barreras vegetales en el manejo integrado de la mancha anular del papayo en Michoacán, México. *Summa Phytopathologica* 34(4):307-312. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052008000400001>
- Rodríguez MD, Alonso M, Tornet Y, Valero L, Lorenzetti ER y Pérez R. 2013. Evaluación de accesiones cubanas de papaya (*Carica papaya*) ante la mancha anular. *Summa Phytopathologica* 39(1):24-27. Disponible en línea:

- http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362014000300004
- Rodríguez MD, de Sousa GDP, González OJ and dos Reis FA. 2014. Molecular and biological studies of papaya ringspot virus isolates from Brazil and Cuba. *American Journal of Agriculture and Forestry* 2(5):209-218. DOI:10.11648/j.ajaf.20140205.11
- Roff MNM. 2007. Disease rating of papaya cultivars to papaya ringspot virus in Malaysia. *Acta Horticulturae*. 740:277-281. Disponible en línea: http://www.actahort.org/books/740/740_34.htm
- Sharma SK and Tripathi S. 2016. Resistance against papaya ringspot virus in *Vasconcellea* species: present and potential uses. In: Gaur RK, Petrov NM, Patil BL and Stoyanova MI (eds.). *Plant Viruses: Evolution and Management*. Springer Science Business Media, Singapore. 312p.
- Siar SV, Beligan GA, Sajise AJC, Villegas VN and Drew RA. 2011. Papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* via introgression from *Vasconcellea quercifolia*. *Euphytica* 181:159-168. DOI:10.1007/s10681-011-0388-z
- Silva-Rosales L, González-de-León D, Guzmán-González S, and Chauvet M. 2010. Why there is no transgenic papaya in México. *Transgenic Plant Journal* 4: 45-51. Disponible en línea: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GS-Online/images/2010/TPJ_4\(SI1\)/TPJ_4\(SI1\)45-51o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GS-Online/images/2010/TPJ_4(SI1)/TPJ_4(SI1)45-51o.pdf)
- Silva-Rosales L, Becerra-Leor N, Ruiz-Castro S, Téliz-Ortiz D and Noa-Carranza JC. 2000. Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of papaya ringspot virus with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. *Archives of Virology* 145:835-843. DOI:10.1007/s007050050676
- Singh V, Rao GP and Shukla K. 2005. Response of commercially important papaya cultivars to papaya ringspot virus in eastern U.P. conditions. *Indian Phytopathology*. 58(2):212-216. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/profile/Vimla_Singh2/publication/268449279_Response_of_commercially_important_papaya_cultivars_to_papaya_ringspot_virus_in_eastern_UP_conditions/links/546c2aff0cf2397f7831d08a/Response-of-commercially-important-papaya-cultivars-to-papaya-ringspot-virus-in-eastern-UP-conditions.pdf
- Sit TL, Abouhaidar MG and Holy S. 1989. Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA. *Journal of General Virology* 70:2325-2331. DOI:10.1099/0022-1317-70-9-2325
- Subramanya SK and Zitter TA. 2014. *Plant Virus and Viroid Diseases in The Tropics*. Vol. 2: Epidemiology and Management. Springer Netherlands. New Delhi, India. 489p.
- Sudha R, Balamohan TN, Soorianathasundaram K, Manivanan N and Rabindran R. 2013. Evaluation of F₂ intergeneric population of papaya (*Carica papaya* L.) for resistance to papaya ringspot virus (PRSV). *Scientia Horticulturae* 158:68-74. DOI:10.1016/j.scienta.2013.04.031
- Sudha R, Balamohan TN, Soorianathasundaram K, Rabindran R and Manoranjitham SK. 2015. Studies on resistance to papaya ring spot virus (PRSV) in intergeneric populations of *Carica papaya* L. and *Vasconcellea cauliflora*. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 47(2): 113-123. Disponible en línea: <http://www.sabrao.org/journals/June2015/SABRAO-J-Breed-Genet-47-2-113-123-Sudha.pdf>
- Taylor D.R. 2001. Virus diseases of *Carica papaya* in Africa: their distribution, importance, and control. Pp:25-32. In: Hughes JDA and Odu BO (eds.). *Plant virology in Sub-Saharan Africa: Proceedings of a Conference Organized by IITA: 4-8 June 2001, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria*. Africa. Disponible en línea: <http://docplayer.net/35000541-Virus-diseases-of-carica-papaya-in-africa-their-distribution-importance-and-control.html>
- Tennant PF, Fermin GA and Roye ME. 2007. Viruses infecting papaya (*Carica papaya* L.): etiology, pathogenesis, and molecular biology. *Plant Viruses* 1(2):178-188. Disponible en línea: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSOnline/images/0712/PV_1\(2\)/PV_1\(2\)178-188o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSOnline/images/0712/PV_1(2)/PV_1(2)178-188o.pdf)
- Tripathi S, Suzuki JY, Ferreira SA and Gonsalves D. 2008. Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology* 9(3):269-280. DOI:10.1111/j.1364-3703.2008.00467.x
- VanBuren R, Zeng F, Chen C, Zhang J and Wai CM. 2015. Origin and domestication of papaya Yh chromosome. *Genome Research*. 25: 524-533. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.183905.114>
- Veena GL and Dinesh MR. 2013. Utilization of wild species and molecular markers in papaya crop improvement. *International Journal of Recent Scientific Research* 4(11):1858-1861. DOI:10.24327/IJRSR
- Vegas A, Trujillo G, Sandra Y y Mata J. 2003. Obtención, regeneración y evaluación de híbridos intergenéricos entre *Carica papaya* y *Vasconcellea cauliflora*. *Interciencia* 28(12):710-714. Disponible en línea: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001200008
- Villegas VN. 2001. Approaches in developing ringspot virus resistant papaya. *Agricultural Sciences Division. Transactions of the National Academy of Science & Technology*. 23:63-70.
- Yanthan JL, C Vasugi, MR Dinesh, MK Reddy and R Das. 2017. Evaluation of F₆ intergeneric population of papaya (*Carica papaya* L) for resistance to papaya ring spot virus (PRSV) *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 6(5): 289-298. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.033>
- Yorobe J M. 2009. Costs and benefits of bioengineered papaya with resistance to papaya ringspot virus in the Philippines. Pp: 23-34. In: GW Norton and DM Hautea (eds.). *Projected impacts of agricultural biotechnologies for fruits & vegetables in the Philippines & Indonesia*. ISAAA-SEAMEO, Philippines. 184 p. Disponible en línea: https://www.isaaa.org/programs/impact_assessment_of_crop_biotechnology/download/Costs%20and%20Benefits%20of%20PRSV-resistant%20Papaya.pdf

Evolution of diagnostic technics for plant viruses

Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos

Ramiro González-Garza*, Biociencia, S. A. de C. V.; Agustín Melgar 2317, Col. Reforma, C.P. 64550, Monterrey, N. L. *Autor para correspondencia: biociencia01@prodigy.net.mx.

Recibido: 06 de Junio, 2017.

Aceptado: 14 de Agosto, 2017.

González-Garza R. 2017. Evolution of diagnostic technics for plant viruses. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 591-610.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-1

Primera publicación DOI: 01 de Septiembre, 2017.

First DOI publication: September 01, 2017.

Resumen. La sintomatología producida por los virus en las plantas enfermas fue la primera forma de detectar e identificar los virus que las afectaban y los nombraron de acuerdo a la sintomatología que producían. El uso de plantas diferenciales infectadas mediante transmisión mecánica, por injerto o vectores, amplió la capacidad de detectar e identificar muchos de los virus fitopatógenos y también llevó a confundir con virosis otras enfermedades causadas por otros agentes infecciosos. La detección por serología usa la interacción de la proteína viral como antígeno contra los anticuerpos producidos contra ellos por un vertebrado. Los primeros métodos serológicos usados para la detección viral fueron de precipitación antígenos-anticuerpo en medio líquido, seguido por la doble difusión en agar y finalmente por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, muy económico en el uso de reactivos, muy sensible y usa un medio sólido de

Abstract. The symptoms caused by viruses in diseased plants were the first way to detect and identify the viruses that affected them and named them according to the symptoms they produced. The use of differential plants infected by mechanical transmission, by grafting or vectors, increased the ability to detect and identify many of the phytopathogenic viruses and also led to confounding other diseases caused by other infectious agents with viruses. Serology detection uses the interaction of the viral protein as an antigen against the antibodies produced against them by a vertebrate. The first serological methods used for viral detection were antigen-antibody precipitation in liquid medium, followed by agar double diffusion and finally by enzyme-linked immunosorbent assay, very economical in the use of reagents, very sensitive and uses a Solid medium for antigen or antibody immobilization which may be different plastics or membranes. Detection of viral nucleic acid by nucleic acid hybridization or polymerase chain reaction is more sensitive than serology, and the latter method combined with second generation sequencers (Next Generation Sequencing) have revolutionized detection of viruses in plants.

Key words: Detection of viruses, differential plants, serology, ELISA, nucleic acid hybridization, PCR, NGS.

inmovilización del antígeno o del anticuerpo que pueden ser diferentes plásticos o membranas. La detección del ácido nucleico viral mediante el método de hibridación de ácidos nucleicos o por la reacción en cadena de la polimerasa es más sensible que la serología y éste último método combinado con los secuenciadores de la segunda generación (Next Generation Sequencing) han revolucionado la detección de virus en los vegetales.

Palabras clave: Detección de virus, plantas diferenciales, serología, ELISA, hibridación de ácidos nucleicos, PCR, NGS.

INTRODUCCIÓN

A diferencia de otros patógenos vegetales, el manejo de las enfermedades virales, basados en métodos directos, como el uso de viricidas para su control, no se han desarrollado a la fecha, por lo tanto, las enfermedades virales se combaten con estrategias indirectas, como el combate al insecto vector, eliminación las plantas enfermas, evitar la siembra de semillas infectadas. Por lo anterior, los métodos de detección e identificación de virus son críticos para el manejo de las enfermedades virales. Los métodos de detección deben de ser lo más convenientes, efectivos, específicos y rápidos (Joo-jin J. 2014) y son reconocidos como el instrumento básico de la virología, porque la exactitud de los estudios dependen directamente de la sensibilidad de éstas técnicas (Salazar 1995).

Los virus han co-evolucionado por millones de años hospedando a los tres dominios de las formas vivientes, arqueobacterias, Bacterias y Eucariotes (Gergerich y Dolja 2006), sin embargo

INTRODUCTION

Unlike other plant pathogens, the management of viral diseases based on direct methods for their control, such as the use of virucides, have not been developed to date. Therefore, viral diseases are fought with indirect strategies, such as fighting the vector insect, eliminating diseased plants, or avoiding the planting of infected seeds. Because of this, the methods to detect and identify viruses are crucial for handling viral diseases. Detection methods must be as convenient, effective, specific, and quick as possible (Joo-jin J. 2014) and are acknowledged as the basic instrument of virology, because the accuracy of the studies depend directly on the sensitivity of these techniques (Salazar 1995).

Viruses have coevolved for millions of years, hosting the three domains of life forms, archaeobacteria, Bacteria, and Eukaryotes (Gergerich and Dolja 2006); however, their knowledge is very recent. Studies on viruses begins with the works by Mayer in 1886, who mechanically transmitted the Tobacco Mosaic Virus (TMV) from a diseased plant to a healthy plant; Iwanowski, in 1892, proved that the sap of these plants remained ineffective after being passed through a porcelain bacteria-proof filter, and Beijerinck, in 1898, discovered the causal agent as "*Contagium vivum fluidum*", and first introduced the word "virus" to differentiate it from the contagious corpuscular fluid containing bacteria or fungal spores, thus giving rise to the science of Virology (Hull R. 2014). Ever since then, researchers have searched for a way to study viruses to detect them in their hosts, identify, and classify all new viruses that were being discovered in this emerging branch of science.

su conocimiento es muy reciente, el estudio de los virus comienza con los trabajos de Mayer en 1886, quien transmitió mecánicamente el Tobacco mosaic virus (TMV) de planta enferma a planta sana; Iwanowski en 1892, demostró que la savia de dichas plantas, seguía infectiva después de pasar por un filtro de porcelana a prueba de bacterias y Beijerinck en 1898 fue quien describió al agente causal como “*Contagium vivum fluidum*”, e introdujo por primera vez la palabra “virus”, para diferenciarlo del fluido contagioso corpuscular que contenía bacterias u esporas de hongos, dando así, inicio a la ciencia de la Virología (Hull R. 2014). Desde ese entonces, los investigadores han buscado como estudiar los virus para poderlos detectar en sus hospederos, identificar y clasificar todos los virus nuevos que se fueron descubriendo en ésta naciente rama de la ciencia.

Detección por Sintomatología

La sintomatología producida por los virus en las plantas, fue la primera forma de detectar e identificar los virus a finales del siglo XIX y su nombre fue asociado con los síntomas que producía, por ejemplo: Tobacco mosaic virus (TMV), Papaya ringspot virus (PRSV), etc., sin embargo muy pronto se dieron cuenta los investigadores, que muchas variantes del mismo virus producían síntomas muy diferentes y por otro lado, muchos virus diferentes producían síntomas muy similares y aunado a ello, las plantas también exhibían síntomas parecidos a virosis como respuesta a condiciones desfavorables del clima, balance nutricional de minerales del suelo, infecciones por patógenos no virales, daño causado por insectos, ácaros, nematodos. Aunque la sintomatología proveía una vital información sobre las enfermedades virales, se requería mucha experiencia de campo para tomar decisiones basados solo por la sintomatología para identificar un virus,

Detection by symptoms

The symptoms produced by the viruses in the plants was the first way to detect and identify viruses in the late 19th Century, and their names were related to the symptoms it produced, such as the Tobacco mosaic virus (TMV), the Papaya ringspot virus (PRSV), etc. However, scientists soon realized that many variants of the same virus produced very different symptoms, and on the other hand, many different viruses produced very similar symptoms, and in addition, plants also presented symptoms similar to a virosis as a response to unfavorable weather conditions, nutrient balances in soil minerals, infections by non-viral pathogens, damage caused by insects, mites, or nematodes. Although the symptoms provided crucial information on viral diseases, much field experience was required to make decisions based only on symptoms to identify a virus. Generally, field inspections must be accompanied by other tests for the correct diagnosis of a viral infection (Naidú and Hughes. 2001).

During the period between 1900 and 1935, there was more attention on the description and identification by the symptoms of the disease, both macroscopically and by abnormalities caused inside the cells observed under light microscopes, called viral inclusions. These were the only aspects that could be studied with the techniques at hand. All was confusing, and the only fact scientists had about viruses was that they were very small and caused diseases. In 1929, Holmes showed that local lesions produced by mechanical inoculation in certain hosts could be used to count the amount of infective viruses. This technique helped study some of the properties of viruses, such as the point of thermal inactivation, point of maximum dilution, and *in vitro* longevity, and it paved the way for the future isolation and purification of the viruses.

generalmente es necesario que las inspecciones de campo sean acompañadas por otras pruebas para la correcta diagnosis de una infección viral (Naidú y Hughes. 2001).

Durante el período (1900 al 1935) la atención fue enfocada a la descripción e identificación por la sintomatología de la enfermedad, tanto macroscópicamente, como anormalidades ocasionadas dentro de las células vistas con microscopía de luz, llamadas inclusiones virales. Estos eran los únicos aspectos que se podían estudiar con las técnicas que tenían disponibles; todo era confusión, lo único que se sabía de los virus, era que éstos eran muy pequeños y causaban enfermedades. Holmes en 1929 demostró que las lesiones locales producidas por inoculación mecánica en ciertos huéspedes, podía ser usado para cuantificar cuantitativamente la cantidad de virus infectivos, esta técnica permitió estudiar algunas de las propiedades de los virus, como: Punto de inactivación térmica, punto de dilución máxima y longevidad *in vitro* y facilitó el camino para el futuro aislamiento y purificación de los virus.

Usando la técnica de transmisión mecánica, muchas de las enfermedades de los vegetales ocasionados por virus filtrables fueron descritas de 1900 a 1935, sin embargo, pronto se encontró que muchas enfermedades con síntomas similares a enfermedades virales, no se transmitían mecánicamente y el criterio de filtrabilidad no se podía aplicar, sin embargo su naturaleza infecciosa se podía comprobar por transmisión por injerto o por vectores, en esa forma, muchas de las enfermedades si fueron causadas por virus que no se transmitían mecánicamente, pero muchas otras, con síntomas de amarillamientos o escobas de bruja, que fueron atribuidas a virus, después se comprobó, que eran causadas por Fitoplasmas o Spiroplasmas u otras bacterias no cultivables y no trasmisible mecánicamente.

Using the mechanical transmission technique, many of the plant diseases caused by filterable viruses were described between 1900 and 1935, although it was soon found that many diseases with symptoms similar to viral diseases were not mechanically transmitted and the filterability criterion could not be applied. However, its infectious nature could be proven by transmission by grafting or by vectors. In this way, many of the diseases were caused by viruses that were not mechanically transmitted, but many others, with symptoms of yellowing or witch's broom, that were attributed to viruses, although it was later proven that they were caused by phytoplasmas or Spiroplasmas or other non-cultivable bacteria and not mechanically transmissible.

Detection with differentiated plants

In 1931, Smith worked with viruses on potatoes and proved that the symptoms could be caused by the combination of several viruses, and in this way, by using differential plants and transmission by insects, he was able to separate Potato virus X (PVX) from Potato virus Y (PVY). By transmitting the latter with the aphid *Myzus persicae* that did not transmit PVX and by mechanical inoculation in *Datura stramonium* he separated PVX, since this plant is immune to virus Y. In this way, he was able to work with pure viruses to determine their host ranges, and for the first time, was able to observe the differences in the virulence of the isolations of one same virus due to the differences in symptoms produced. Until that moment, the use of differential plants and their range of hosts, using mechanical inoculation or by grafting or with the use of vectors, was the only way to identify viruses in plants. Tables 1, 2, and 3 show the different symptoms in the differential plants that were used to

Detección por Plantas diferenciales

En 1931 Smith trabajó con virus en papa y demostró que la sintomatología podía ser causada por la combinación de varios virus, en esta forma, utilizando plantas diferenciales y transmisión por insectos, pudo separar el Potato virus X (PVX) del Potato virus Y (PVY), al transmitir éste último mediante el áfido *Myzus persicae* que no transmitía el PVX y por inoculación mecánica en *Datura stramonium* separó el virus PVX, porque ésta planta es inmune al virus Y; en ésta forma pudo trabajar con virus puros, para determinar su rango de hospederos y por primera vez pudo observar las diferencias en virulencia de los aislamientos de un mismo virus por las diferencias en la sintomatología producida. Hasta ese momento, el uso de plantas diferenciales y su rango de hospederos, usando inoculación mecánica o por injerto o mediante el uso de vectores, era la única forma de identificar los virus en vegetales. En los Cuadros 1, 2 y 3 se observan los diferentes síntomas en las plantas diferenciales

Cuadro 1. Rango de hospederos y sintomatología para el diagnóstico del PRSV (tres semanas postinoculación).

Table 1. Range of hosts and symptoms for the diagnosis of the PRSV (three weeks postinoculation).

| Nombre científico | Sintomatología ^x | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------|
| | Local | Sistémica |
| <i>Carica papaya</i> | MC | DF, A, M |
| <i>Cucumis melo</i> | ns | ns |
| <i>Cucumis sativus</i> | ns | ns |
| <i>Nicotiana debnyii</i> | ns | ns |
| <i>Nicotiana glutinosa</i> | ns | ns |
| <i>N. tabaccum cv. Samsun</i> | ns | ns |
| <i>Chenopodium quinoa</i> | LL | ns |
| <i>Ch. amaranticolor</i> | ns | ns |
| <i>Datura stramonium</i> | ns | ns |

^xMC= Mancha clorótica; DF= Distorsión foliar; A= Achaparramiento; M= Mosaico; LL= Lesiones locales; ns= No síntomas / ^xMC= Chlorotic spot; DF= Foliar distortion; A= Stunting; M= Mosaic; LL= Local lesions; ns= No symptoms.

identify the Papaya ringspot virus (PRSV), for the Cucumber Mosaic Virus (CMV) (Kelaniyangoda and Madhubashini 2008), and 10 different viruses in potatoes (Salazar 1995). In this way, symptom comparison charts were drawn so all viruses could be identified, using mechanical transmission or by vectors or grafting. The use of differential plants to detect viruses is still common in several fruit trees such as citrus, pome, and rosaceae plants (Roistacher 1991).

Detection by serology

The birth of serology for the identification of viruses that affect plants began with the discovery by Beale in 1928, who showed that the plants infected by the Tobacco mosaic virus (TMV) contained a specific antigen, different to those of the healthy plant, when both saps were injected into different rabbits. Later, in 1933, Gratia showed that plants infected with different viruses contained

Cuadro 2. Rango de hospederos y sintomatología para diagnóstico del CMV.

Table 2. Range of hosts and symptoms for the diagnosis of CMV.

| Nombre científico | Sintomatología ^x | |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----------|
| | Local | Sistémica |
| <i>Nicotiana glutinosa</i> | ns | ns |
| <i>N. tabaccum cv. White burley</i> | ns | ns |
| <i>Capsicum annuum</i> | ns | DF, M |
| <i>Nicotiana debnyii</i> | ns | ns |
| <i>N. tabaccum cv. Xanthi</i> | ns | ns |
| <i>Datura stramonium</i> | ns | M |
| <i>Solanum melongena</i> | ns | DF, Mot |
| <i>Chenopodium quinoa</i> | LL | ns |
| <i>Gomphrena globosa</i> | LL | ns |
| <i>Physalis floridana</i> | ns | ns |
| <i>Cucumis sativus</i> | ns | ns |

^xDF= Distorsión foliar; MC= Manchas cloróticas; Mot= Moteado; M= Mosaico; LL= Lesiones locales; ns= No síntomas / ^xDF= Foliar distortion; MC= Chlorotic spots; Mot= Dotted; M= Mosaic; LL= Local lesions; ns= No symptoms.

**Cuadro 3. Rango de hospedantes para el diagnóstico biológico de algunos virus de la papa (*Solanum tuberosum*).
Table 3. Range of hosts for the biological diagnosis of some viruses in potatoes (*Solanum tuberosum*).**

| Huesped | Virus | | | | | | | | | |
|----------------------------|------------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|------|------|
| | PVX | PVY | PVA | PRLV | PVS | PVM | PVT | APMV | APLV | PMTV |
| <i>Nicotiana tabaccum</i> | L,S ^x | S | S | -- | -- | -- | -- | S | S | -- |
| <i>N. devalandi</i> | S | S | S | -- | -- | -- | -- | S | S | -- |
| <i>N. glutinosa</i> | S | S | S | -- | -- | -- | -- | S | S | -- |
| <i>N. devneyi</i> | S | S | S | S | S | L | -- | S | S | S |
| <i>Physalis floridana</i> | L,S | L,S | S | S | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Solanum lycopersici</i> | S | S | S | -- | -- | S | -- | -- | -- | -- |
| <i>Datura stramonium</i> | S | -- | -- | S | -- | -- | -- | S | -- | -- |
| <i>D. metel</i> | S | S | S | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Gonphrena globosa</i> | L | -- | -- | -- | L | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Chenopodium quinoa</i> | L | -- | -- | -- | L,S | -- | S | -- | L | -- |
| <i>Ch. Amaranticolor</i> | L | -- | -- | -- | L | -- | S | -- | L | L |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | -- | -- | -- | -- | -- | L | L | -- | -- | -- |
| Clon de papa A6 | L | L | L | -- | L | -- | -- | S | S | -- |

^xL= Lesión local y S= Lesión sistémica; --= Ausencia de síntomas. PRLV fue inoculado por áfidos o injerto, el resto, por inoculación mecánica / ^xL= Local lesion; S= Systemic lesion; --= absence of symptoms. PRLV was inoculated by aphids or grafting, and the rest, by mechanical inoculation.

que eran utilizados para la identificación de Papa-ya ringspot virus (PRSV), Cucumber mosaic virus (CMV) (Kelaniyangoda and Madhubashini 2008), y 10 diferentes virus en papa (Salazar 1995), en esa forma se realizaban cuadros comparativos de síntomas para todos los virus que podían ser identificados, utilizando transmisión mecánica, vectores o por injerto. La detección de virus mediante plantas diferenciales se sigue utilizando en muchos frutales como cítricos, pomáceos y rosáceos (Roistacher 1991).

DetECCIÓN POR SEROLOGÍA

El nacimiento de la serología para la identificación de los virus que afectan a los vegetales comenzó con el descubrimiento de Beale en 1928 demostrando que las plantas infectadas por el Tobacco mosaic virus (TMV) contenían un antígeno específico diferente a los de la planta sana, cuando ambas savias eran inyectadas en conejos diferentes, posteriormente Gratia en 1933, demostró que las plantas infectadas con diferentes virus, contenían antígenos

diferentes específicos antígenos, and finally, Chester, in 1935 and 1936, showed that the different TMV and PVX isolations could be told apart serologically (Hull R 2004).

As progress was being made in the methodology for the purification of viruses, mainly with the discovery by Brakke (1951 and 1953) of centrifugation in differential gradients using different concentrations of lithium chloride, caesium chloride or sulphate, and later, with the development of centrifugation in saccharose gradients of 10 to 40%, on which the infective sap was formed, (Lister, 1966 and 1968), the virus was separate, forming a strip, in which its density would equal the density of the saccharose. With the purified viruses, the specific antisera were formed for each of the purified viruses that already helped for the differential identification of the different viruses that affected plants.

The first serological methods used to detect and identify plant viruses were by reacting to the antibodies and the viruses (antigens) in liquid media and forming precipitates that could be viewed

específicos diferentes y por último Chester en 1935 y 1936 demostró que diferentes aislamientos de TMV y del PVX podían ser distinguidos serológicamente (Hull R 2004).

Conforme se fue avanzando en la metodología para la purificación de los virus, principalmente con el descubrimiento de Brakke (1951 y 1953) de la centrifugación en gradientes diferenciales usando diferentes concentraciones de cloruro de litio, cloruro o sulfato de cesio y posteriormente, con el desarrollo de la centrifugación en gradientes de sacarosa de 10% al 40%, sobre el cual se colocaba la savia infectiva (Lister, 1966 y 1968), el virus se separaba formando una banda donde su densidad igualara a la densidad de la sacarosa. Con los virus purificados se produjeron los antiseros específicos para cada uno de los virus purificados y que servían ya, para la identificación diferencial de los diferentes virus que afectaban a los vegetales.

Los primeros métodos serológicos utilizados para la detección e identificación de virus vegetales fueron reaccionando los antiseros y los virus (antígenos) en medios líquidos y formando precipitados que podían ser observados a simple vista. Las partículas virales son polivalentes, esto es, cada partícula viral puede reaccionar con varias moléculas del anticuerpo que es divalente, esta reacción forma una estructura látice que al crecer forma el precipitado visible (Matthews 1970), a ésta reacción se le llama “de precipitación”, la reacción de aglutinación de cloroplastos y de otros organelos celulares es cuando se hace reaccionar una gota de savia infectiva de una planta cuyo virus no se conoce con una gota de antiseros específicos de virus conocidos, colocadas en un portaobjeto y observada la reacción bajo microscopio de disección. La unión de los anticuerpos con las partículas virales formaba una trama (estructura látice) que en su entrelazado precipita junto a cloroplastos y otros organelos celulares (Kleczkowski 1965).

by the naked eye. Viral particles are polyvalent, meaning that each viral particle can react with several molecules of the antibody that is divalent. This reaction forms a lattice structure that forms the visible precipitate during growth (Matthews 1970). This is called a “precipitation” reaction. The reaction of the agglutination of chloroplasts and other cell organelles is when a drop of infective sap of a plant with an unknown virus is made to react with a drop of specific antisera of known viruses, placed in a tray, and observed under a dissection microscope. The union of the antibodies with the viral particles formed a structure (lattice) that, in its weaving, precipitates, along with chloroplasts and other cell organelles (Kleczkowski 1965).

Another widely used method in the 1960's and 1970's was double diffusion in agar, a method carried out on trays or Petri dishes, with great advantages such as the following: (i) the mixtures of the molecules of the antigens and antibodies are physically separated due to their degree of diffusion in the gel, and (ii) several antigens or antibodies can be compared, placed in neighboring cells on the same tray or sheet (Ouchterlony 1962). The antigens and antibodies diffuse one against the other in the agar, and after a while, a precipitation zone is formed when they reach an acceptable concentration, which can be visible to the naked eye, or by staining with protein dyes and photographed (Figure 1). The diffusion of the viral antigen in the agar depends strongly on the size and shape of the virus. Isometric viruses diffuse in a satisfactory manner, although rod-shaped viruses diffuse slower or not at all. Splitting by sonification helps the diffusion in agar of the latter and the formation of the precipitate (Tomlinson and Walkey 1967). The main disadvantage of these models is the large volume of antiserum used in each detection reaction.

Otro método muy utilizado en la década de los 1960 y 1970 fue la doble difusión en agar, las grandes ventajas de éste método llevado a cabo en portaobjetos o cajas de Petri son: (i) las mezclas de las moléculas de los antígenos y anticuerpos están físicamente separados, por su diferente grado de difusión en el gel y (ii) se pueden comparar varios antígenos, o anticuerpos, colocados en celdas vecinas en una misma placa o cubreobjeto (Ouchterlony 1962). Los antígenos y los anticuerpos difunden uno en contra del otro en el agar y después de un tiempo se forma una zona de precipitación cuando alcanzan una concentración aceptable, la cual puede ser visible a simple vista o con tinción de proteínas y fotografiada (Figura 1). La difusión del antígeno viral en el agar depende fuertemente del tamaño y forma del virus, los isométricos difunden satisfactoriamente pero los de varilla difunde más lento o no difunden, el rompimiento por sonicación ayudan a la difusión en el agar de éstos últimos y la formación del precipitado (Tomlinson y Walkey 1967). El principal inconveniente de estos métodos, es el gran volumen de antisuero que se usa en cada reacción de detección.

Los métodos de detección serológica de precipitación en medio líquido fueron usados por aproximadamente 20 años y fueron progresivamente sustituidos por los métodos de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay) o ELISA por sus siglas en inglés. Clark y Adams (1977) mostraron que el método de ELISA en placa podía ser efectivamente aplicado a la detección de virus vegetales, desde ése tiempo a la fecha, dicho método ha sido ampliamente usado. Muchas variantes del procedimiento básico han sido desarrolladas con el objetivo de optimizar la prueba para propósitos particulares.

El método es muy económico en el uso de los reactivos y rápidamente adaptado a las mediciones cualitativas y cuantitativas. Puede ser aplicado a

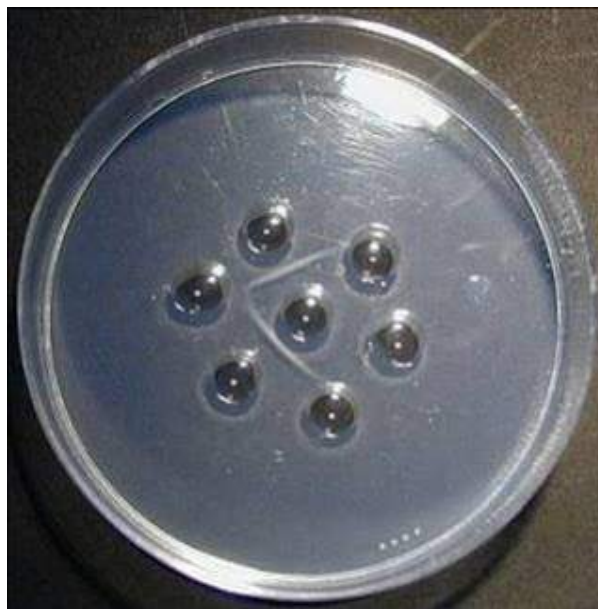


Figura 1. Se enfrentan antígenos y anticuerpos colocándolos en hoyos o pozos circulares adyacentes hechos en la agarosa para que formen líneas de precipitación entre ellos. Tomado de: <http://mesa54dinmuno.blogspot.mx/2009/05/tecnicas-inmunologicas.html>.

Figure 1. Antigens and antibodies confront each other when placing them in circular adjacent holes or wells made in the agarose so they form precipitation lines between them. Taken from: <http://mesa54dinmuno.blogspot.mx/2009/05/tecnicas-inmunologicas.html>.

The serological detection methods of precipitation in liquid media were used for approximately 20 years and progressively replaced by enzyme-linked immunosorbent assays, or ELISA. Clark and Adams (1977) showed that the ELISA method could be effectively applied to the detection of plant viruses. From that moment to date, this method has been widely used. Many variants of the basic procedure have been developed in an attempt to optimize the test for particular purposes.

The method is very cost-effective in the use of the reagents, and quickly adapted to qualitative and quantitative measurements. It can be applied

virus de varios tipos de morfología y de preparaciones purificadas o de extractos crudos (Figura 2). Es muy sensible, pudiendo detectar concentraciones de 1 – 10 ng/ml. Los métodos aplicables de ELISA más comunes son: ELISA en placa; ELISA en membrana (immunobloting) empleando ya sea antisueros policlonales o monoclonales; inmunoadsorción-microscopía electrónica (ISEM por sus siglas en inglés) e inmunocromatografía o tiras reactivas (Immunochromatographic or Strip Tests) (Hull, R 2014).

to viruses of several types of morphologies and purified preparations or raw extracts (Figure 2). It is very sensitive, since it can detect concentrations of 1 – 10 ng/ml. The most common applicable methods of ELISA are: ELISA on plates; ELISA on membranes (immunobloting), using polyclonal or monoclonal antisera; Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM) and immunochromatographic or Strip Tests (Hull, R 2014).

The most commonly used Plate ELISA types in plant pathology are: double antibody sandwich



Figura 2. Chile jalapeño afectado por la sinergia del Cucumber mosaic virus (CMV) y del Tobacco etch virus (TEV), detectados por la técnica de ELISA en placa, en un barrido (screening) para los 13 virus más comunes utilizando el macerado de la planta infectada.

Figure 2. Jalapeño peppers affected by the synergy of the Cucumber mosaic virus (CMV) and the Tobacco etch virus (TEV), detected by the plate ELISA technique, in a screening for the 13 most common viruses using the macerate of the infected plant.

Los tipos de ELISA en placa de uso más común en patología vegetal son: ELISA de sándwich de doble anticuerpo (DAS.- double antibody sándwich), ELISA de sándwich de triple anticuerpo (TAS.-Triple antibody sándwich) y ELISA de placa sensibilizada con antígeno (ACP.- antigen coated plate) (Figura 3).

Los métodos de ELISA en membrana en sus formas más comunes, inmuno-gota (immuno dot) e inmuno-impresión (immuno printing), es la impresión en una membrana de nitrocelulosa o nylon de una microgota (aplicada en microlitros) de un macerado vegetal o la impresión de un corte de una hoja, pecíolo, tallo u otro tejido vegetal, directamente sobre la membrana respectivamente. En los métodos de ELISA en placa, el desarrollo del color se realiza con un sustrato soluble y en la ELISA en membrana, se sustituye por un sustrato precipitante que es insoluble y que se adhiere a la membrana y su lectura se realiza a simple vista o con un densitómetro de reflectancia.

La impresión directa del tejido en la membrana (inmuno-impresión) tiene varias ventajas: 1).- da una información detallada de la distribución del virus en el tejido; 2).- no es requerido el macerado de tejidos y por ende, no se diluyen los virus restringidos a ciertos tejidos, con el aumento lógico de su sensibilidad; 3).- la técnica es perfectamente aplicada a muestras de campo y la inmuno-impresión puede realizarse directamente en el campo, sin necesidad de llevar la colecta de muestras al laboratorio. En la ELISA de inmuno-adsorción-microscopía electrónica (ISEM por sus siglas en inglés), aumenta significativamente la sensibilidad de la detección del virus bajo microscopio electrónico.

La inmunocromatografía o tira reactiva, es la prueba rápida más utilizada en la actualidad para la detección de innumerables patógenos vegetales y es producido por la mayoría si no es que todos de los proveedores internacionales de kits de diagnóstico. Existen inmunotiras para detectar decenas de

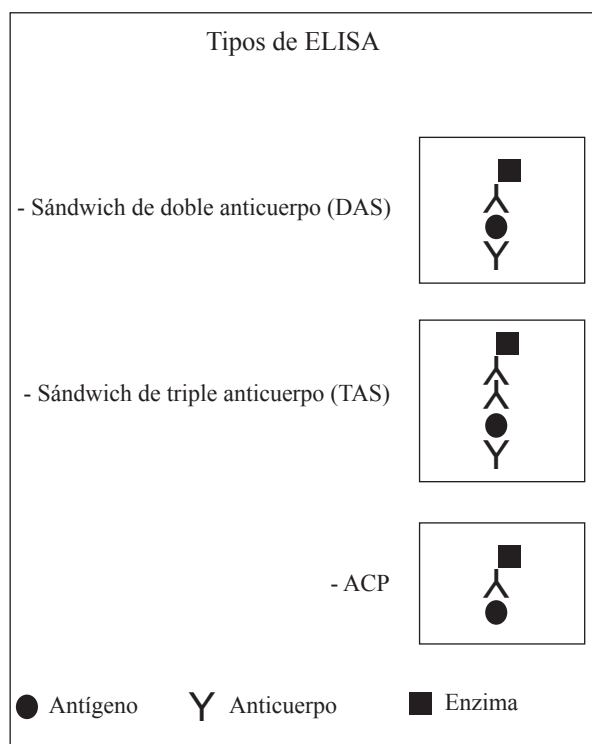


Figura 3. Representación esquemática de los tipos de ELISA más usados en fitopatología.

Figure 3. Schematic representation of the most commonly used types of ELISA in plant pathology.

ELISA (DAS), Triple antibody sandwich ELISA (TAS), and antigen coated plate ELISA (ACP) (Figure 3).

The ELISA methods on membranes in its most common methods, immuno dot and immuno printing, is printing on a nitrocellulose or nylon membrane of one microdrop (applied in microliters) of a plant extract or the print of a cut of a leaf, petiole, stem, or other plant tissue, directly on the membrane, respectively. In the ELISA methods on plates, the color is developed with a soluble substrate, and on the ELISA on membranes, it is replaced by a precipitant substrate that is insoluble and adheres to the membrane and it is read with the naked eye using a reflectance densitometer.

patógenos vegetales que son utilizadas directamente por los agricultores en pruebas rápidas de campo, cuyos resultados se obtienen en minutos de realizada la prueba (Figura 4). La serología sigue siendo en la actualidad, a través de los diversos tipos de ELISA, los métodos de diagnóstico más utilizados para la detección de virosis en humanos, animales y vegetales.

Aunque los métodos serológicos son los más utilizados en diagnóstico de virus, tienen ciertas desventajas. Son basados en las propiedades antigénicas de la cubierta proteica de los virus, la cual re-

The direct printing of the tissue on the membrane (immuno printing) has several advantages: 1).- it provides detailed information of the distribution of the virus in the tissue; 2).- there is no need to macerate tissues, and therefore, the viruses restricted to certain tissues do not dilute, with the logical increase in sensitivity; 3).- the technique is perfectly applied to field samples and immuno-printing can be carried out on the field, without the need of taking the samples to the laboratory. In the Immunosorbent Electron Microscopy ELISA (ISEM), the sensitivity of the detection of



Figura 4. Begonia afectada por el Impatiens necrotic spot virus (INSV) detectado por la prueba de campo de ELISA- inmunocromatografía, en 5 minutos de exposición de la tira reactiva a la sabia infectada.

Figure 4. Begonia affected by the Impatiens necrotic spot virus (INSV) detected using the ELISA field test - immunochromatography, in 5 minutes of exposure of the reactive strip to the infected sap.

presenta aproximadamente solo el 10% del genoma total del virus (Gould and Symons 1983) y no toma en cuenta el resto del genoma viral. Los métodos basados en la detección de los ácidos nucleicos, tienen la ventaja de que pueden ser dirigidos a cualquier región del genoma viral para ser usado en la técnica de diagnóstico. Además, hay situaciones en que los métodos inmunológicos tienen aplicación limitada, en particular para la detección de viroides, ARNs satélites, virus que carecen de cápside (por ejemplo: Groundnut rosette virus (GRV) género *Umbravirus* (<http://viralzone.expasy.org/645>), the NM-form of tobacco rattle virus), virus que tienen serotipos extremadamente diversos (ejemplo: Indian y African Peanut clump virus y Tobacco rattle virus) y virus que son pobres inmunógenos o que son difíciles de purificar.

Detección mediante métodos moleculares

La detección de virus mediante métodos moleculares puede ser usada cuando existe conocimiento de cuando menos de parte de la secuencia del genoma del virus (Joo jin J 2014).

Hibridación de ácidos nucleicos

Se usa principalmente con dos propósitos, para determinar el grado de relación de dos secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, de dos virus y para la detección de virus u otros patógenos. Las diagnósticos de virus por hibridación de ácidos nucleicos, se lleva a cabo inmovilizando el ácido nucleico prueba, en membranas de nitrocelulosa o nylon.

El ensayo de hibridación por puntos (dot) o manchas (spot) es una técnica comúnmente utilizada en la detección de virus vegetales (Owens y Dinner 1984), el proceso implica la hibridación sólido-líquido, donde: a).- el ácido nucleico prueba (el ácido nucleico viral de la muestra) es colocado e inmovilizado sobre una membrana de nitroce-

the virus increases significantly under an electron microscope.

Immunochromatography, or reactive strip, is the quickest test currently used to detect countless plant pathogens, and it is produced by most, if not all, international diagnosis kit suppliers. There are ImmunoStrips to detect dozens of plant pathogens that are used directly by farmers in quick field tests, the results of which are obtained mere minutes after the tests have been performed (Figure 4). Serology is still being used to date through different types of ELISA, the most commonly used diagnosis methods for the detection of virosis in humans, animals, and plants.

Although serological methods are the most commonly used in viral diagnoses, they have certain disadvantages. They are based on the antigenic properties of the protein covers of the viruses, which accounts for only approximately 10% of the total genome of the virus (Gould and Symons 1983) and does not take the rest of the viral genome into account. The methods based on the detection of the nucleic acids have the advantage of being able to be directed to any region of the viral genome to be used in the diagnosis technique. Likewise, there are situations in which the immunological methods have a limited application, particularly for the detection of viroids, satellite RNAs, viruses that lack capsids (for example: Groundnut rosette virus (GRV) genus *Umbravirus* (<http://viralzone.expasy.org/645>), the NM-form of tobacco rattle virus), viruses with extremely diverse serotypes (for example, Indian and African Peanut clump virus and Tobacco rattle virus), and viruses that are poor immunogens, or that are difficult to purify.

Detection by molecular methods

The detection of viruses by molecular methods can be used when there is knowledge of at least a part of the virus genome sequence (Joo jin J 2014).

lulosa o de nylon positivamente cargada, b).- Los sitios libres de unión de la membrana son posteriormente bloqueados con un DNA no homólogo (generalmente esperma de salmón o DNA del timo de becerro) o con proteína (generalmente albumina bovina, albumina de huevo o caseína de leche), c).- permitir que la hibridación se lleve a cabo entre la unión del ácido nucleico viral y la sonda, la cual está libre en la solución de hibridación, d).- el exceso de sonda que no hibridó es removida mediante serie de lavados con determinada astringencia, e).- la secuencia prueba es detectada por la molécula reportera usada en la sonda hibridada.

Las sondas radioactivas usando como reportero al ^{32}P están prácticamente en desuso por la vida tan corta y lo peligroso del ^{32}P radioactivo y han sido reemplazadas por sondas no radioactivas y de ellas la que más se usa en virología es el sistema Dioxigenina (DIG)/antiDIG. En este sistema la membrana es expuesta post-hibridación a anticuerpos antiDIG unidos a la enzima fosfatasa alcalina o peroxidasa. La señal es producida al agregar el sustrato adecuado que resulta en un producto cromógeno precipitado.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1986 el Dr. Kary Mullis desarrolló la PCR, técnica de Biología Molecular que amplifica un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de la ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean cuatro pasos: a).- desnaturalización a alta temperatura (normalmente entre 94 ó 95 °C) para separar las hebras del ADN; b).- anillado de los dos primers a su secuencia complementaria en sus dos hebras de ADN y cuya temperatura depende del tamaño y composición nucleotídica del primer; c).- la extensión del

Hybridization of nucleic acids

This is used mainly with two purposes: to determine the relationship degree between two sequences of nucleic acids, for example, to viruses, and for the detection of viruses or other pathogens. The diagnoses of viruses by the hybridization of nucleic acids are carried out by immobilizing the test nucleic acid in membranes of nitrocellulose or nylon.

The dot or spot hybridization test is a commonly used technique in the detection of plant viruses (Owens and Dinner 1984). The process implies the solid-liquid hybridization, where: a).- the test nucleic acid (the viral nucleic acid of the sample) is placed and immobilized on a positively charged nitrocellulose or nylon membrane, b).- the union-free sites of the membrane are then blocked with a non-homologous DNA (generally salmon sperm or DNA from a calf thymus) or with protein (generally bovine albumin, egg albumin or milk casein), c).- allow the hybridization to take place between the union of the viral nucleic acid and the probe, which is free in the hybridization solution, d).- the excess probe which it did not hybridize is removed by a series of washings with a particular astringence, e).- the test sequence is detected by the reporting molecule used in the hybridized probe.

The radioactive probes that use ^{32}P as a reporter are practically discontinued due to the short life and the danger of radioactive ^{32}P , and have been replaced by non-radioactive probes, the most widely used of which, in virology, is the Dioxigenin (DIG)/antiDIG system. In this system, the membrane is exposed, post-hybridization, to antiDIG antibodies joined to the enzyme alkaline phosphatase or peroxidase. The signal is produced when adding the adequate substrate the results in a precipitated chromogenic product.

primer para formar la cadena complementaria por la ADN polimerasa, normalmente a 72 °C y d).- la extensión final durante 5 ó 10 minutos con la misma temperatura (Naidu y Huges, 2001). En cada ciclo las nuevas hebras de ADN sirven de plantilla para los nuevos ciclos por lo que repitiendo los primeros tres pasos 30 ó 40 veces en un termociclador automático, la cantidad de nuevas hebras de ADN amplificadas suman millones y pueden ser analizadas en un gel de agarosa tiñendo el ADN con bromuro de etidio que revela la amplificación realizada, a ésta técnica se le llama PCR de punto final. La velocidad, la especificidad, la versatilidad de la técnica de la PCR la hicieron la más adecuada y la más utilizada en muchas áreas de la Biología Molecular y la más atractiva en el diagnóstico de las enfermedades virales de los vegetales (Rodríguez y Barrera 2004) (Figura 5).

Para aumentar la sensibilidad de la PCR, se usa la PCR Anidada, conocida también como Nested PCR, en ella se usan dos rondas de amplificación con distintos pares de primers en cada una, primero se realiza una amplificación con los primers externos y con el producto de esa amplificación se realiza otra amplificación utilizando primers internos, aumentando así la sensibilidad de la técnica. Ésta técnica se usa cuando la concentración del virus u otro patógeno es muy baja y es muy usada para detectar Fitoplasmas.

La PCR multiplex es otra variante de la PCR tradicional (punto final), mediante la cual se pueden detectar 2 ó más virus o 2 ó más distintos fragmentos de ADN blanco en la misma reacción. La amplificación se realiza utilizando 2 ó más pares de primers y aumentando proporcionalmente los reactivos de la reacción, ahorrando tiempo en la detección múltiple de patógenos.

En caso de que los virus a detectar sean de genoma de ARN, la PCR tiene un paso previo, se tiene que retrotranscribir la hebra de ARN, en ADN

Polymerase chain reaction (PCR)

In 1986, Dr. Kary Mullis developed PCR, a molecular biology that amplifies a large number of copies of a particular DNA fragment. This technique is based on the natural property of DNA polymerases to replicate DNA, which requires four steps: a).- denaturalization at a high temperature (normally between 94 and 95°C) to separate the DNA strands; b).- annealing of the first two primers to their complementary sequence in their two DNA strands, the temperature of which depends on the size and the nucleotide composition of the primer; c).- the extension of the primer to form de complementary chain by the polymerase DNA, normally at 72 °C, and d).- the final extension for 5 or 10 minutes with the same temperature (Naidu and Huges, 2001). In each cycle, the new DNA strands act as a template for the new cycles, and therefore repeating the first three steps 30 or 40 times in an automatic thermocycler, the amount of new amplified DNA strands add up to millions and can be analyzed in an agarose gel, staining the DNA with ethidium bromide, which reveals the amplification performed; this technique is called end-point PCR. The speed, specificity, and the versatility of PCR made it more adequate and the most widely used in many areas of molecular biology and the most attractive in the diagnosis of viral diseases in plants (Rodríguez and Barrera 2004) (Figure 5).

Nested PCR is used to increase the sensitivity of the PCR. Here, two amplification rounds are used with different pairs of primers in each. First, an amplification is carried out with the external primers and another amplification is carried out with the product of that amplification, using internal primers, therefore increasing the sensitivity of the technique. This technique is used when the concentration of the virus or another pathogen is



Figura 5. Hoja de planta de melón afectado por un Begomovirus detectado mediante la técnica de PCR punto final, usando primers específicos para el género Begomovirus.
Figure 5. Leaf of melon plant affected by Begomovirus detected by the end-point PCR technique, using primers specific for the genus Begomovirus.

complementario, mediante la utilización de una enzima llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Una vez transcrito en ADN complementario, se realiza una PCR convencional para su amplificación y se conoce como RT-PCR.

La técnica de la PCR, ha evolucionado también para evitar el uso del gel de agarosa como la del punto final. La técnica del PCR Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés) combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados. Desde el año 1966, Le Pecq y Paoletti reportaron que el bromuro de etidio

very low, and it is very commonly used to detect Phytoplasmas.

The multiplex PCR is another variation of the traditional end-point PCR, which can be used to detect 2 or more viruses or 2 or more different fragments of white DNA in the same reaction. The amplification is carried using 2 or more pairs of primers and increasing the reagents of the reaction proportionally, saving time in the detection of multiple pathogens.

If the viruses to be detected belong to an RNA genome, PCR has a previous step. The RNA strand must be retrotranscribed in complementary DNA with an enzyme called retrotranscriptase

(EtBr) intercalante del ADN de doble cadena fluoresce bajo la luz UV. Esta propiedad fue aprovechada para grabar la acumulación de ADN utilizando una videocámara. Esta sencilla reacción combinada con la videografía permitió el nacimiento del PCR en tiempo real, el cual combina la enorme sensibilidad de la técnica de PCR con la precisión que asegura el monitoreo *in situ* de los productos generados por esta reacción a través del tiempo. La qPCR puede utilizar fluoróforos generales o no específicos de unión al ADN, como el Bromuro de Etidio o el SYBR Green I, el reportero más usado es el SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que cuando está en solución, no emite fluorescencia, sin embargo cuando se une al surco menor del ADN su fluorescencia aumenta 1000 veces, o métodos de fluorescencia específicos parten de principios diferentes de los no específicos y tienen en común que la señal fluorescente es emitida solo al detectar los productos amplificados (Temay *et al.*, 2013). Los métodos específicos siguen el principio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia de diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando éste par de moléculas se separa la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector. (Rodríguez, M. y William, R. 2006.; Estefanía *et al.*, 2015).

La PCR digital (dPCR), a diferencia de la PCR tiempo real (qPCR) no necesita estándares de referencia o curvas de calibración para la cuantificación de ácidos nucleicos, sino directamente produce una cuantificación precisa de ácidos nucleicos. En la dPCR, la muestra de PCR es dividida en miles de

or reverse transcriptase. Once transcribed in the complementary DNA, a conventional PCR is carried out for its amplification, and it is known as RT-PCR.

The PCR technique has also evolved to avoid the use of agarose gel, like the end-point. The Real Time PCR or quantitative PCR (qPCR) combines the steps of DNA amplification in a single trial and avoids having to prepare electrophoresis gels to detect the amplified products. In 1966, Le Pecq and Paoletti reported that ethidium bromide (EtBr) intercalante of the double chain DNA fluoresces under UV light. This property was used to record the accumulation of DNA using a videocamera. This simple reaction, combined with the video taken, allowed the real-time birth of PCR, which combines the enormous sensitivity of the PCR technique with the precision that ensures the “*in situ*” monitoring of the products generated by this reaction in time. The qPCR technique can use general fluorophores or unspecific for the union of DNA, such as ethidium bromide or SYBR Green I, the latter of which is the most widely used reporter, a positively charged molecule that, when in solution, does not fluoresce. However, when it joins the minor groove of the DNA, its fluorescence increases 1000 times. The specific fluorescence methods start from different principles to the unspecific ones, and they have in common that the fluorescent signal is only emitted when detecting the amplified products (Temay *et al.*, 2013). The specific methods follow the FRET (Fluorescence Resonance Energy transfer) principle, which consists of the transfer of energy between two fluorophores: a donor (reporter) and an acceptor (quencher), which emit fluorescences with different wavelengths. When the reporter and the quencher are near, the quencher absorbs all the fluorescence of the reporter. When this pair of molecules separates, the fluorescence of the reporter cannot be absorbed by the quencher, and could

nanogotas y después de la amplificación, las gotas que contienen la secuencia del ADN blanco, se detectan por fluorescencia como positivas y las que no fluorescen como negativas. El análisis estadístico de Poisson del número de nanogotas positivas nos da una cuantificación exacta del ADN blanco, esto permite cuantificar la carga viral u otro patógeno o de otro ADN blanco cualquiera de una muestra (Biorad. Introduction to Digital PCR. Tomado de: <http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/introduction-digital-pcr>). La desventaja de las técnicas de la PCR mencionadas, es que todas requieren de un termociclador y un laboratorio bien equipado y de personal especializado para realizar los diagnósticos.

La Amplificación de ADN Isotérmica es una metodología que se lleva a cabo a temperatura constante por lo que a diferencia de la PCR convencional no necesita del uso de un termociclador, ni de laboratorios muy equipados. Se han usado varias estrategias moleculares para lograr dicha amplificación, las enumero por su nombre en español, el originales en inglés con su acrónimo: Amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), Amplificación por desplazamiento de hebras (strand-displacement amplification, SDA), Amplificación dependiente de la Helicasa (Helicase-dependent amplification, HDA), Amplificación del círculo rodante (Rolling-circle amplification, RCA), Amplificación de secuencias de ácido nucleico (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) y Amplificación de polimerasa recombinante (Recombinase polymerase amplification, RPA). Varias empresas de diferentes países están produciendo kits de diagnóstico comerciales para detección de fitopatógenos con una u otra de estas tecnologías, así, TwistDx, www.twistdx.co.uk y Agdia, Inc. www.agdia.com usa la tecnología RPA; Ac Diagnostics, Inc. www.acdiainc.com usa la tecnología NASBA; Diageneticx,

consequently be detected by the photodetector. (Rodríguez, M. and William, R. 2006.; Estefanía *et al.*, 2015).

Digital PCR (dPCR), unlike real time PCR (qPCR) requires no reference standards or calibration curves for the quantification of nucleic acids, but rather produces an accurate quantification of nucleic acids. In dPCR, the PCR sample is divided into thousands of nanodrops and after amplification, the drops that contain the sequence of the target DNA are detected by fluorescence as positive, and those without fluorescence, as negative. The Poisson statistical analysis of the number of nanodrops gives an exact count of the target DNA, and this helps count the charge of viruses or another pathogen or of any other white DNA in a sample (Biorad. Introduction to Digital PCR. Taken from <http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/introduction-digital-pcr>). The disadvantage of the PCR techniques mentioned is that they all require a thermocycler and a well-equipped lab, as well as staff trained to carry out a diagnosis.

Isothermal DNA amplification is a methodology that is carried out at a constant temperature, and therefore, unlike conventional PCR does not require the use of a thermocycler or highly-equipped labs. Several molecular strategies have been used to achieve this amplification. The following is a list of their names and their acronyms: Loop-mediated isothermal amplification, LAMP; Strand-displacement amplification, SDA; Helicase-dependent amplification, HDA; Rolling-circle amplification, RCA; Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA; and Recombinase polymerase amplification, RPA. Several companies from different countries are producing commercial diagnosis kits for the detection of phytopathogens with one or another of these technologies. Thus TwistDx, www.twistdx.co.uk, and Agdia,

Inc. www.bloomberg.com usa la tecnología LAMP, por mencionar algunas. Todas éstas metodologías tienen ventajas y desventajas, según la recopilación realizada por Zaghoul, H y El-shahat, M (2014), la única de éstas técnicas que solo tiene ventajas es la RPA.

Next-generation (high throughput) sequencing (NGS) Segunda generación de secuenciadores

Es una tecnología que se ha desarrollado en los últimos años y está visualizada para ser un parteaguas en la Biología Molecular en todas sus ramas, su importancia estriba en que ha bajado significativamente el costo y el tiempo con respecto a la secuenciación tradicional Sanger. Las cuatro principales plataformas modernas que hay de NGS; Illumina (Solexa) sequencing; Roche 454 sequencing; Ion torrent: Proton / PGM sequencing y SOLiD sequencing, producen grandes cantidades de lecturas (millones a miles de millones) de secuencias cortas de 25 a 400 pb, aunque recientemente ya hay plataformas que leen hasta 700 pb.

Como se puede observar en la Figura 6, el costo por secuenciar una megabase del año 2001 al 2013 fue reducido dramáticamente. Durante éste período fue usado la primera generación de secuenciadores del 2001 al 2007 y la segunda generación de secuenciadores del 2008 al 2013. El costo por megabase secuenciada fue reducido de \$8000 (dólares americanos) en el 2001 a \$700 para el 2007 y después a \$0.10 en el 2013 (Figura 6 A). Similarmente, el costo por genoma de ADN secuenciado fue de \$100, 000,000 (dólares americanos) en el 2001 a \$10, 000,000 en el 2007 y a 8,000 en el 2013 (Figura 6 B).

Esta nueva tecnología ha traído consigo también una nueva terminología, como la “Metagenómica” definida como la aplicación de las nuevas tecnologías genómicas para el estudio de comunidades

Inc. www.agdia.com use RPA technology; Ac Diagnostics, Inc. www.acdiainc.com uses NASBA technology; Diageneticx, Inc. www.bloomberg.com use LAMP technology, to mention a few. All these methodologies have advantages and disadvantages, according to the compilation made by Zaghoul, H and El-shahat, M (2014); the only one of these technologies that only has advantages is RPA.

Next-generation (high throughput) sequencing (NGS)

This technology was created in the past few years and was visualized as a groundbreaker in molecular biology in all its branches; its importance lies in that it has significantly reduced costs and time in comparison to Sanger traditional sequencing. The four main modern platforms that currently exist [Illumina Solexa] sequencing; Roche 454 sequencing; Ion torrent: Proton / PGM sequencing and SOLiD sequencing) produce large amounts of readings (between millions and billions) of short sequences, from 25 to 400 pb, although nowadays, there are platforms that read up to 700 pb.

As Figure 6 shows, the cost of sequencing a megabase between the years 2001 and 2013 was dramatically reduced. During this period, the first generation of sequencers was used from 2001 to 2007, and the second generation, from 2008 to 2013. The cost per sequenced megabase dropped from USD\$8000 in 2001 to \$700 for 2007, and later, to \$0.10 in 2013 (Figure 6 A). Similarly, the cost per sequenced DNA genome was USD \$100, 000,000 in 2001 to \$10, 000,000 in 2007 and to 8,000 in 2013 (Figure 6 B).

This new technology came hand-in-hand with a new terminology, such as “Metagenomics,” defined as the application of new genomic technologies for the study of communities of microorganisms

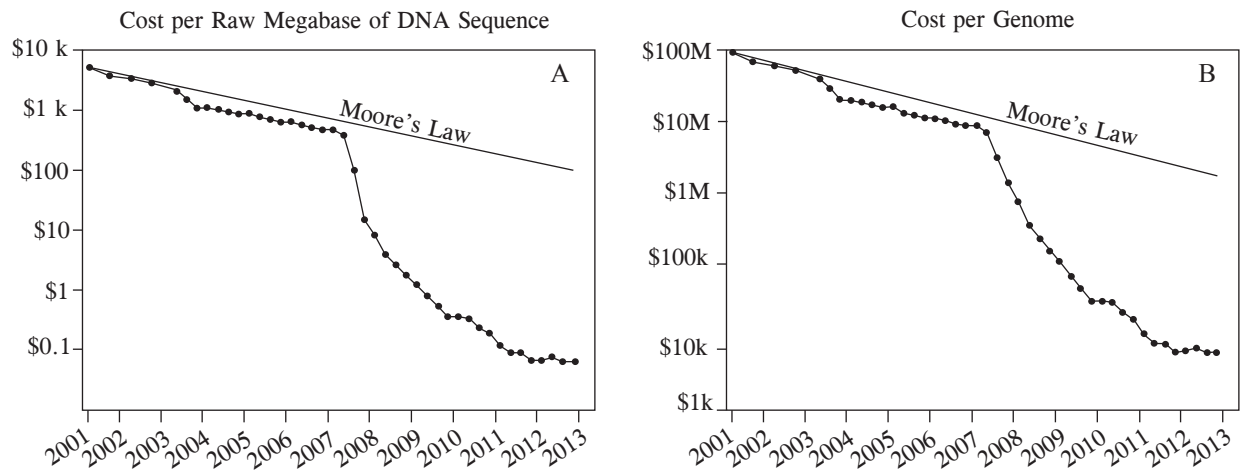


Figura 6. Costo en dólares americanos por megabase de ADN secuenciado (A) y costo por genoma (B) de julio de 2001 a julio del 2013 estimado por el National Human Genome Research Institute, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Durante este período la primera generación de secuenciador fue usado (Sanger) del 2001 al 2007, después las plataformas de NGS fueron usadas del 2007 al 2013 (Marina *et al.*, 2014).

Figure 6. Cost in US dollars per megabase of DNA sequencing (A) and cost per genome (B) from July, 2001 to July 2013, estimated by the National Human Genome Research Institute, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. In this period, the first generation of sequencers was used (Sanger) from 2001 to 2007, after the NGS platforms were used between 2007 and 2013 (Marina *et al.*, 2014).

de microorganismos directamente en su ambiente natural, sin tener que ser aislados y cultivados en el laboratorio. “Secuenciado de transcriptomas” que incluye la secuenciación y análisis de todos los mRNA completos y los microARN.

La NGS combinada con una bioinformática sofisticada ha cambiado el campo de la virología vegetal principalmente en las áreas de secuenciación de genomas, ecología, descubrimiento, epidemiología, transcriptomas, replicación, detección e identificación. “Viroma” se refiere a describir la carga viral (virus y viroides) que infectan a un organismo, vegetal o animal incluyendo a vectores. Muchos nuevos virus y viroides han sido identificados usando la tecnología de NGS ya sea en forma directa secuenciando sus genomas o incluso en forma indirecta, ensamblando los pequeños fragmentos de ARNs que se producen como respuesta a las infecciones causadas por los virus y los viroides (Marina *et al.*, 2014).

directly in their natural habitat, without having to isolate and cultivate them in the lab; or the “Sequencing of transcriptomes,” that includes the sequencing and analysis of all the complete mRNA’s and microRNA’s.

The NGS, combined with sophisticated bioinformatics, has changes the field of plant virology, mainly in the areas of genome sequencing, ecology, discoveries, epidemiology, transcriptomes, replication, detection, and identification. “Virome” refers to the viral load (viruses and viroids) that infect an organism, plant or animal, including vectors. Many new viruses and viroids have been identified using NGS technology, whether directly, sequencing their genomes, or even indirectly, assembling the small fragments of siRNA produced as a response to the infections caused by viruses and viroids (Marina *et al.*, 2014).

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

## LITERATURA CITADA

- Brakke MK. 1951. Density gradient centrifugation: A new separation technique. *Journal of the American Chemical Society*. 73:1847-8. <https://doi.org/10.1021/ja01148a508>
- Brakke M K, 1953. Zonal separations by density-gradient centrifugation. *Arch Biochem Biophys* 45:275– 90. Tomado de: Hull R, 2014. *Matthew's Plant Virology*. Academic press, London. 778 p. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(53\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(53)80005-6)
- Barba M, Czosnek H and Hadidi A. 2014. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*. 2014 Jan; 6(1): 106-136. <https://doi.org/10.3390/v6010106>
- Clark MF and Adams AN. 1977. Characteristic of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34:475-483. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>
- Estefanía C, Bayron J y Barreto A. 2015. PCR en tiempo Real. *Biología Molecular-Camilo Herrera*. Universidad de las Américas. Disponible en línea: <https://es.slideshare.net/Alejatoxik/pcr-en-tiempo-real-55369307>
- Gergerich RC and Dolja V. 2006. Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2006-0414-01>
- Gould AR and Symons RH. 1883. A molecular biological approach to relationship among viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 21: 179-99. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.21.090183.001143>
- Höltke HJ, Ankenbauer W, Mühlegger K, Rein R, Sagner G, Seibl R and Walter, T. 1995. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. Nov;41(7):883-905. Tomado de: Henson JM and French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000501>
- Hull R. 2014. *Matthew's Plant Virology*. Elsevier, Academic Press. 1001 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384871-0.00023-6>
- Joo-jin J, Ho-jong J and Jaejong N. 2014. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease*. 20:173-181. <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
- Kelaniyangoda DB and Madhubashini LWM. 2008. Indicator plants: Tools for Detecting Papaya Ring Spot Potyvirus and Cucumber Mosaic Cucumovirus. *Journal of Food and Agriculture*. Vol.1(2) pp.64-69. <http://doi.org/10.4038/jfa.v1i2.1800>
- Kleczkowski A. 1965. A study of the effects of salt and pH on precipitation of antigen-antibody compounds, *Immunology* 8: 170-181 Tomado de: Matthews 1970. *Plant Virology*. Academic press, London. 778 p. <http://doi.org/10.4038/jfa.v1i2.1800>
- Lister RM. 1966. Possible relationship of virus specific products of tobacco rattle virus infection. *Virology*. 28: 350-353. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90161-9)
- Lister RM. 1968. Functional relationship between virus-specific products of infection by viruses of the tobacco rattle type. *Journal of General Virology*. 2: 43-58. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-2-1-43>
- Naidu RA and Hughes JdA. 2001. Methods for the detection of plant virus diseases. *Plant Virology in Sub-Saharan Africa*. En: Kumlachew A. 2015. *Detection of Diseases, Identification and Diversity of Viruses: A Review*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. Vol.5, No.1. Disponible en línea: <http://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/19521>. DOI: 10.1007/978-81-322-0813-6
- Outcherlony O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progr. Allergy*. En: Matthews 1970. *Plant Virology*. Academic press, London. 778 p. <https://doi.org/10.1159/000313795>
- Owens RA and Diener TO. 1984. Spot hybridization for the detection of viroids and viruses. Pages 173–189. In: *Methods in Virology Vol. VII*, edited by K. Maramorosch and H. Koprowski. Academic Press, New York, USA. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-470207-3.50012-7>
- Piepenburg O, Williams, CH, Stemple DL and Armes NA. 2006. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol* 4(7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- Purdy HA. 1928. Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and IVied.*, XXV, 702-703. En: Scholthof, K-B. G. 2008. *Tobacco Mosaic Virus: The Beginning of Plant Pathology*. Online. APSnet Features. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeatures-2008-0408>
- Rodríguez IPS y Barrera HAS. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL/Vol VII No.3*: 323-35. Disponible en línea: [http://eprints.uanl.mx/1584/1/art\\_cadena.pdf](http://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf)
- Rodríguez M y William R. 2006. PCR en Tiempo Real. Métodos químicos-físicos en Biotecnología. IBT-UNAM. 55p. Disponible en línea: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime\\_pcr.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf)
- Roistacher CN. 1991. *Graft-transmissible Diseases of Citrus*. Handbook for detection and diagnosis. IOC, Riverside and FAO, Rome. 286 pp. Disponible en línea: [https://archive.org/details/bub\\_gb\\_9zY1uFgChAgC](https://archive.org/details/bub_gb_9zY1uFgChAgC)
- Salazar Luis 1995. *Los virus de la papa y su control*. CIP. Perú. 226 p. disponible en línea: <https://books.google.com.mx>
- Tammy DL, Ibarra C y Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. Vol. 2, Num 2: 70-78. Disponible en línea: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invidis/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tomlinson JA and Walkey DGA. 1967. Effects of ultrasonic treatment on Turnip Mosaic Virus and Potato Virus X. *Virology*. 32: 267-278. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90276-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90276-0)
- Welkin EJ (tomado de: Scott C. Weaver, Mark Denison, Marilyn Roossinck and Marco Vignuzzi). 2016. *Virus Evolution: Current Research and Future Directions*. Caister Academic Press. 366 p. <https://doi.org/10.21775/9781910190234>
- Zaghoul H and El-shahat M. (2014). Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis. *World Journal of Hepatology*. 6(12): 916-922. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i12.916>

# *In vitro* evaluation of extracts from the *Lilium* genus to control *Fusarium oxysporum*

## Evaluación *in vitro* de extractos del género *Lilium* para el control de *Fusarium oxysporum*

**Anygim Senyase Iturbide-Zuñiga, María Teresa Beryl Colinas-León\***, Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México; **Héctor Lozoya-Saldaña**, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México; **Sergio Alejandro Medina-Moreno**, Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, km 20 Carretera Pachuca-Ciudad Sahagún, Ex Hacienda Santa Bárbara, Zempoala, Hidalgo, 43830, México; **Juan Ayala-Arreola**, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México. \*Autor para correspondencia: lozcol@gmail.com.

**Recibido:** 26 de Septiembre, 2016.

**Aceptado:** 11 de Abril, 2017.

Iturbide-Zuñiga AS, Colinas-León MTB, Lozoya-Saldaña H, Medina-Moreno SA, Ayala-Arreola J. 2017. *In vitro* evaluation of extracts from the *Lilium* genus to control *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 611-622.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1609-6

Primera publicación DOI: 25 de Mayo, 2017.

First DOI publication: May 25, 2017.

**Resumen.** Se evaluó el efecto antifúngico de extractos de bulbos de *Lilium* híbrido L/A “Indian summer” sobre *Fusarium oxysporum* considerado como hongo patógeno que provoca daños severos en la agricultura y pérdidas económicas en diversos sectores de la industria. El extracto crudo se fraccionó en tres sub-extractos de acuerdo a la polaridad (polar, medianamente polar y no polar), los cuales se sometieron a bioensayos de inhibición siendo papa-dextrosa-agar (PDA) el tratamiento

**Abstract.** The effect of antifungal plant extracts of bulbs of *Lilium* hybrid L/A “Indian summer” were evaluated on *Fusarium oxysporum*, which is considered a pathogenic fungus that causes serious damage to agriculture and economic losses to various sectors of industry. The crude extract was fractionated into three sub-extracts according to their polarity (polar, moderately polar and non-polar), and then subject to bioassays of inhibition being potato-dextrose-agar (PDA) the control. The moderately polar extract showed the highest inhibition, decreasing the growth rate by 27 % compared to the mycelial growth in the control. However, when it was compared to plant extracts reported under similar conditions, it was discarded as a growth inhibitor and considered as fungistatic.

**Key words:** fungicide, fungistatic, phenols.

*Lilium* is an ornamental crop of major importance in the market worldwide and ranked



testigo. Las muestras que se trataron con el extracto medianamente polar presentaron la mayor inhibición, al disminuir la tasa de crecimiento en un 27 %, en comparación al crecimiento micelial del testigo. Sin embargo, al comparar con extractos vegetales que reportaron bajo condiciones similares, se descarta como inhibidor del crecimiento y se considera como fungistático.

**Palabras clave:** fungicida, fungistático, fenoles.

*Lilium* es un cultivo ornamental de gran importancia en el mercado mundial y ocupa el décimo primer lugar en demanda y el segundo lugar en plantas bulbosas en México (Gómez, 2009), lo anterior se atribuye principalmente a la diversidad de colores que se han logrado a través de la hibridación entre especies asiáticas y orientales; y la disponibilidad de la flor en prácticamente todo el año, gracias a los sistemas intensivos de producción (Álvarez *et al.*, 2008). Estas prácticas son las que conducen a los horticultores a implementar programas de control de plagas y enfermedades que si bien no se erradican, logran reducir las altas tasas de crecimiento de patógenos. Sin embargo, no consideran las consecuencias de utilizar indiscriminadamente fertilizantes o plaguicidas de naturaleza química que repercuten directamente en el suelo, aire y agua (Ortega *et al.*, 2006). Por lo que es conveniente la implementación oportuna de programas de control de patógenos por medio de alternativas amigables con el medio ambiente, que además de reducir los costos, son una alternativa para evitar la contaminación por el uso de agentes químicos que además inducen la resistencia en el microorganismo (Keng *et al.*, 2010; Bhromsiri y Bhromsiri, 2010). Tal es el caso del uso de extractos vegetales, aceites esenciales, extractos orgánicos y enzimáticos que dan la apertura al biocontrol de patógenos

11<sup>th</sup> in demand and 2<sup>nd</sup> among bulbous plants in Mexico (Gómez, 2009). This is mainly attributed to its flower color diversity, which has been possible through hybridization among Asiatic and Eastern species, as well as the availability of flowers almost all the year round through intensive production systems (Álvarez *et al.*, 2008).

These practices lead growers to implement pest and disease control programs that do not succeed in eradicating them, but do help decrease the high rate of pathogen development. However, those programs do not take into consideration the consequences of the indiscriminate use of chemical fertilizers or pesticides that directly affect natural resources as soil, air and water (Ortega *et al.*, 2006). For this reason, it is convenient to establish pathogen control programs in time and seek environment-friendly alternatives which, aside from cutting costs, help prevent pollution caused by the use of chemical agents that induce resistance in microorganisms (Keng *et al.*, 2010; Bhromsiri and Bhromsiri, 2010). That is the case of plant extracts, essential oils, organic and enzymatic extracts that mark the beginning of pathogens control in intensive agriculture because they have proven to be effective at controlling the growth of bacteria, nematodes and phytopathogens isolated from a wide variety of crops (Rodríguez *et al.*, 2012; Alcalá de Marcano *et al.*, 2005; Chávez and Aquino, 2012; Vinueza *et al.*, 2006). In the specific case of *Lilium*, bulbs are disposed after the crop cycle ends, so a way of reusing them could be extracting active compounds for the control of *Fusarium oxysporum* fungus, since mycosis causes loss of tissue turgence and fruit rot, stem end or root rot, minor infections, and eventually the plant dies. In summary, these are the problems that growers face every year.

The objective of this study was to determine the antifungal activity of extracts of *Lilium* bulbs

en la agricultura intensiva ya que han demostrado efectividad ante el crecimiento de bacterias, nematodos y hongos fitopatógenos aislados de una amplia diversidad de cultivos (Rodríguez *et al.*, 2012; Alcalá de Marcano *et al.*, 2005; Chávez y Aquino, 2012; Vinueza *et al.*, 2006). En el caso específico de *Lilium*, los bulbos se desechan después de terminar el cultivo, por lo que una forma de reutilizarlos pudiera ser la extracción de compuestos activos en el control del hongo *Fusarium oxysporum* ya que la micosis que produce causa pérdida de turgencia de tejidos y la pudrición de frutos, de cuello o raíces de la planta, infecciones menores y posteriormente la muerte del huésped, estos son problemas a los que se enfrentan los productores año con año.

El objetivo del trabajo fue determinar la actividad antifúngica de extractos de bulbos de *Lilium* que se obtuvieron después de la cosecha de la flor como una medida para reutilizar un órgano considerado residuo al término de la producción, que no cuenta con un manejo adecuado además de representar una fuente potencial de contaminación. La cepa que se utilizó fue *Fusarium oxysporum* conservada en glicerol y agar nutritivo, la cual se aisló de suelos destinados a cultivos experimentales por el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo. Los bulbos de *Lilium* se obtuvieron de un único lote de importación de la empresa “Van den Bos Flowerbulbs B.V” provenientes de Dijkweg, Honselersdijk, Holanda. El lote estaba conformado por 300 piezas de bulbos calibre 14/16 del género *Lilium* híbridos L/A de la variedad “Indian summer”. Los bulbos se lavaron primero con agua de la llave para retirar impurezas y septos dañados, después con agua destilada, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 5 min. Al finalizar se enjuagó en agua desionizada. Se pesó 50 g de bulbos y se maceraron con un mínimo de agua desionizada (5 mL) en un mortero desinfectado. El extracto ob-

collected after flower harvest as a way of reusing an organ considered a residue at the end of the production cycle and which is not properly managed and could be a source of contamination. The isolate used was *Fusarium oxysporum* kept in glycerol and nutrient agar that was obtained from soils allocated to experiment crops by the Parasitology Department of Universidad Autónoma Chapingo. *Lilium* bulbs were taken from a single lot imported from Dijkweg, Honselersdijk, The Netherlands, by the company Van den Bos Flowerbulbs B.V. The lot consisted of 300 size 14/16 bulbs of the *Lilium* genus L/A hybrids Indian Summer variety. The bulbs were first washed with running water to remove impurities and damaged septa, then with distilled water and disinfected with 1.5 % sodium chloride for 5 min. Finally, they were rinsed in deionized water. Fifty g of bulbs were weighed and macerated with a minimum of deionized water (5 mL) in a disinfected mortar. The extract obtained was filtered with a cotton cloth and then with filter paper (Papel Whatman®); this procedure was repeated three times. The filtered extracts were placed in sterile vials and kept at 4 °C until they were used. For morphological characterization, *Fusarium oxysporum* was sown in Petri dishes filled with agar-potato-dextrose (PDA), according to BD Bioxon® directions. Each of the developed colonies were isolated and purified using the hypha-point method. Considering 10 sampling units (10 Petri dishes containing axenic culture), a macroscopic-morphological characterization was performed and permanent preparations were made and observed under a microscope. Atypical structures were observed whose length and width were measured in each unit. Their genus was confirmed according to the Barnett and Hunter procedure (1998). The incubation conditions for the extract were as follows: after obtaining the raw plant extract (EVC), it was split according to the

tenido se filtró en un paño de algodón y después con papel filtro (Papel Whatman®) esto se repitió tres veces. Los extractos filtrados se colocaron en viales estériles y se mantuvieron a 4 °C hasta su empleo. Para llevar a cabo la caracterización morfológica, *Fusarium oxysporum* se sembró en caja Petri con agar-papa-dextrosa (PDA) de acuerdo a BD Bioxon®. Cada colonia desarrollada se aisló y purificó por el método punta de hifa. Considerando 10 unidades de muestreo (10 cajas Petri con cultivos axénicos) se realizó la caracterización morfológica macroscópica y las preparaciones permanentes para observar al microscopio. Se identificaron las estructuras típicas y se midió el largo y ancho de las mismas en cada unidad. Se confirmó el género con base en las claves de Barnett y Hunter (1998). Las condiciones de incubación del extracto fueron las siguientes: Una vez obtenido el extracto vegetal crudo (EVC), se procedió al fraccionamiento por afinidad en la polaridad de compuestos analizados por cromatografía de capa fina (CCP) en el cual se emplearon placas de sílica gel GF 254 de 0.25 mm de espesor y se corrieron en los eluyentes hexano 100 %, acetato de etilo 100 % y etanol 100 %. Posteriormente al definir los eluyentes para el fraccionamiento de los extractos vegetales se obtuvo el extracto no polar (ENP) con hexano al 100 % en una relación 1:1, el extracto medianamente polar (EMP) se obtuvo con el eluyente acetato de etilo al 100 % en una relación 1:1 y el extracto polar (EVP) se obtuvo con etanol al 100 % en una relación 1:1.

La identificación molecular inició con la extracción de ADN la cual se realizó a partir de 30 a 50 mg de micelio. El procedimiento se repitió a partir de 3 muestras del hongo con los oligos ITS-1 5'-tcgtaggtgaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tctccgcttattgatatgc-3' (White et al., 1990); los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable de aproximadamente 800 a 1200 pares de bases (pb). Esta práctica se realizó

polarity affinity of the compounds analyzed by thin-layer chromatography (CCP) using 25-mm-thick silica gel plates GF 254, and run in 100 % eluent hexane, 100 % ethyl acetate and 100 % ethanol. Later, when defining the eluents to split the plant extracts, the non-polar (ENP) extract was obtained using the 100 % ethyl acetate eluent at a 1:1 ratio, the polar extract (EMP) using the 100 % ethyl acetate eluent at a 1:1 ratio, and the polar extract (EVP) using 100 % ethanol at a 1:1 ratio.

The first step in molecular identification was DNA extraction, which was performed with 30 to 50 mg of mycelium. The procedure was repeated using 3 samples of the fungus with the oligos ITS-1 5'-tcgtaggtgaacctgcgg-3' and ITS-4 5'-tctccgcttattgatatgc-3' (White et al., 1990) that amplify an internal transcribed spacer (ITS) and yields a product of variable size that contains approximately 800 to 1200 base pairs (pb). This task was performed with a mixture of reaction in a 25 µL final volume whose final components were: reaction buffer (1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTP's), 200 nM of each, 20 pmoles of each oligonucleotide, and 1 unit of Taq DNA polymerase. The thermal program involves keeping 2 min at 94 °C, 30 seg at 55 °C and 1 min at 72 °C (35 cycles). The products resulting from the PCR reaction were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels, the PCR bands were observed in an UV Transilluminator (UVP brand) and pictures were taken. The amplified fragments were directly sequenced and the results compared with the sequences stored in the (GenBank) Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

For pathogenicity tests, 7 bulb flakes of the *Lilium* hybrid L/A Indian summer variety were used. They were disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for 5 min and then rinsed with deionized water. Each flake was considered as an experiment unit in a complete randomized design.

con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, cuyos componentes finales fueron: amortiguador de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTP's, 200 nM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa. El programa térmico consiste en mantener 2 min a 94 °C, 30 seg a 55 °C y 1 min a 72 °C (35 ciclos). Los productos de la reacción de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %, y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se tomaron fotografías. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados directamente y los resultados se compararon con las secuencias del banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

En las pruebas de patogenicidad, se utilizaron 7 escamas de bulbos de *Lilium* híbrido L/A "Indian summer" que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por 5 min. y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada. Se consideró cada escama como unidad experimental en un arreglo completamente al azar. La cepa previamente aislada se cultivó en medio PDA durante 8 días para el incremento de inóculo, después se preparó una suspensión de conidias en agua destilada estéril; la cual se ajustó a una concentración de 80x10<sup>3</sup> propágulos·mL<sup>-1</sup> como lo indican Díaz *et al.* (2014), se asperjaron las escamas de *Lilium* con un volumen aproximado de 2 mL de la suspensión de esporas. Como testigo se utilizó una escama que solo se enjuagó con agua desionizada. Las 7 unidades experimentales se colocaron en cajas Petri de vidrio previamente estériles y se incubaron a 26 °C ± 2 °C. Los síntomas se registraron diariamente por 15 días. De las zonas afectadas por invasión micelial se tomó tejido el cual se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min. y se enjuagó 2 veces con agua desionizada. Después se sembraron en cajas Petri con medio PDA. La

The isolate that was previously isolated was sown in PDA medium for 8 days for inoculum increase, and then a suspension of conidia was prepared in sterile distilled water, adjusted to a concentration of 80x10<sup>3</sup> propagules mL<sup>-1</sup> as stated by Díaz *et al.* (2014), and the flakes were spread with spore suspension (approximately 2mL in volume). As control we used the flake that was rinsed only with deionized water. The 7 experiment units were placed in 8 previously sterilized Petri dishes and incubated at 5 at 26 °C ± 2 °C. Symptoms were recorded daily for 15 days. From the areas affected by mycelial invasion, tissue was taken, disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for 2 min and rinsed twice with deionized water. Then, the samples were sown in Petri dishes containing PDA medium. The concentration of the plant extract in the medium was 30 %, incubation period: 23 h, incubation temperature: 25 °C +/-1.

The morphological-macroscopic features (color, shape and colony spreading) and microscopic (hypha, sclerotium, conidium, metula, phialid, etc.) were compared with those originally inoculated to prove Koch postulates. For repellency bioassays (antibiograms), 20 mL of plant extract were previously added for analysis along with 100 mL of PDA for sterilization; then it was distributed in Petri dishes 100 X 155 mm in diameter (Araujo *et al.*, 2007). When the culture medium solidified, sowings were made in the middle of each plaque using a 5x5 mm sample of *F. oxysporum* that was previously reactivated in liquid medium (nutrient broth) for 48 h and then transferred to solid medium (PDA) for the next 48 h. Mycelial growth was measured every 24 h at the four quadrant directions of the Petri dishes and the diameter of the inhibition halo was measured (in mm) until complete development was observed in the Petri dish containing the control (without plant extract). We carried out an analysis of the

concentración del extracto vegetal en el medio fue al 30 %, tiempo de incubación: 23 d, temperatura incubación: 25 °C +/- 1.

Las características morfológicas macroscópicas (color, forma y propagación de colonia) y microscópicas (hifa, esclerocio, conidia, métula, fiálide, etc.) se compararon con las originalmente inoculadas, para comprobar los postulados de Koch. Para la realización de los bioensayos de repelencia (antibiogramas), previamente se adicionaron 20 mL de extracto vegetal a analizar con 100 mL de PDA para su esterilización, posteriormente se distribuyó en cajas Petri de 100 X 155 mm de diámetro (Araujo *et al.*, 2007). Cuando el medio de cultivo se solidificó se hicieron las siembras en el centro de cada placa, con una muestra de 5x5 mm con *F. oxysporum* el cual se reactivó previamente en medio líquido (caldo nutritivo) por 48 h. y se transfirió a medio sólido (PDA) por las 48 h. siguientes. El crecimiento micelial se midió cada 24 h en los cuatro sentidos del cuadrante de la caja de Petri y se reportó el diámetro del halo de inhibición en mm hasta que la caja Petri del testigo (sin extracto vegetal) presentó un crecimiento completo. A los datos se les realizó un análisis de varianza (ANAVA). De igual forma se efectuó una prueba de comparación de medias utilizando el método Tukey con nivel de significancia al 5 %. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Statistical Analysis System.

Las colonias aisladas de *Fusarium oxysporum* presentaron en su morfología macroscópica, durante las primeras 72 h una coloración blanquecina y una conformación algodonosa (Figura 1a) que inició en el punto de siembra y se extendió conforme a la propagación de nuevas hifas. Después de las 144 h se observó una coloración de rosa a púrpura siendo mayormente intensa al inicio del crecimiento (Figura 1b) y más tenue hacia los bordes con un color lila-rosado. La pigmentación púrpura –oscuro

data using variance analysis (ANAVA). Similarly, a median comparison test with 5 % significance level was performed according to Tukey's method. All the statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System software.

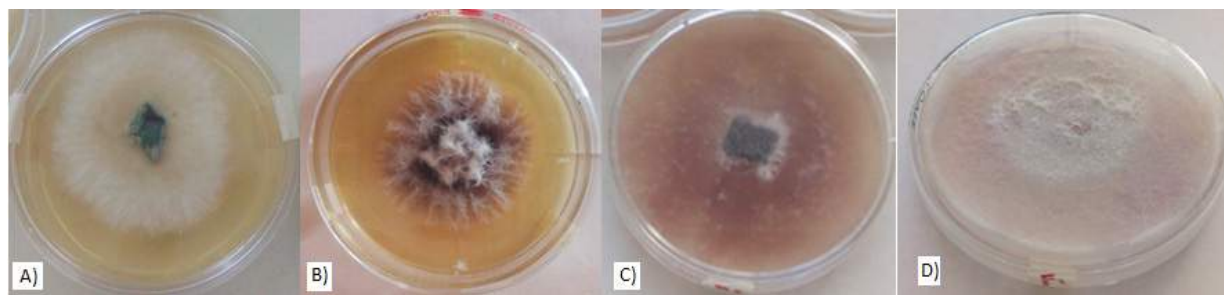
In their macroscopic morphology, the *Fusarium oxysporum* colonies isolated showed whitish and cottony shapes during the first 72 h (Figure 1a) that started to appear when they were sown and extended as new hyphae developed. After 144 h, we observed a pinkish-purple color that grew in intensity when the colonies started to grow (Figure 1b) and became lighter with lilac-pinkish tones towards the edges. The purple dark pigmentation was uniform after 312 h (Figure 1c and Figure 1d). The mature isolate produced branched hyphae 3-4.5µm in diameter, single and short phialides, abundant cylindrical micronidia and thin macronidia with a slightly curve and apical cell (Figure 1d).

In the molecular characterization, the size of the isolate identified as *Fusarium* was of 1040 pb, which agrees with the size expected for this species. The obtained sequence was 99 % similar to the ITS region whose alignment was in agreement with *F. oxysporum* CM000589.1.

The pathogenicity test confirmed the ability of the available isolate to develop typical fusariosis symptoms in septa of *Lilium* hybrids L/A bulbs. After 96 h, we observed the first signs of infection on the septum's meristematic tissue as yellowish-brownish spots (Figure 2). After 144 h, the damaged area showed degraded tissue, and from these areas an aliquot was taken to be resown in Petri dishes and confirm the presence of *Fusarium oxysporum*, according to Koch's postulates.

As for inhibition bioassays, the effect of the plant extracts on *Fusarium* sp. mycelial growth *in vitro* is shown in Table 1.

There is a significant difference among the treatments being the row plant extract (EVC)



**Figura 1. Morfología del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* A) 72 h, B) 144 h, C) 240 h y D) 312 h.**  
**Figure 1. Morphology of *Fusarium oxysporum* mycelial growth A) 72 h, B) 144 h, C) 240 h and D) 312 h.**

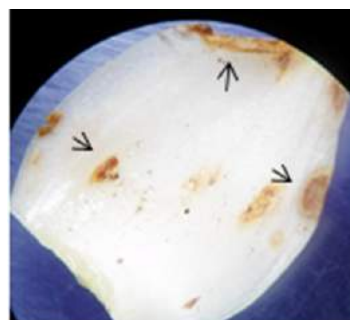
se observó uniforme después de 312 h (Figura 1c y 1d). La cepa madura presentó hifas ramificadas de 3 - 4.5µm de diámetro, fiálides cortas simples, Microconidias cilíndricas abundantes y Macroconidias delgadas con una célula apical ligeramente curva (Figura 1d).

En la caracterización molecular, el aislamiento identificado como *Fusarium* tuvo una talla de 1040 pb que concuerda con la talla esperada para la especie. La secuencia obtenida tuvo un 99 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con *F. oxysporum* CM000589.1

La prueba de patogenicidad confirmó la capacidad de la cepa disponible para generar la sintomatología típica de una fusariosis en septos de bulbos de *Lilium* híbridos L/A. Después de 96 h se observaron las primeras señales de la infección sobre el tejido meristemático del septo en forma de manchas amarillentas-pardas (Figura 2). Después de 144 h el área dañada presentaba tejido degradado y de estas zonas se tomó una alícuota para resembrar en caja Petri, confirmando la presencia de *Fusarium oxysporum* de acuerdo a los postulados de Koch.

En el caso de los bioensayos de inhibición, el efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. *in vitro* se puede observar en el Cuadro 1.

the statistically higher treatment at 48 h with an increase of 79% compared with the PDA treatment, since it acted as mycelial growth stimulator. In the case of the intermediately polar extract (EMP), there was a statistical difference lower than the difference in the control with a decrease of 27% and a low inhibitory effect. At 96 h, EVC decreased the mycelial growth ratio, but it was kept as the treatment with a higher statistical difference with an increase of 54% compared with the control. On the other hand, EMP presented a lower statistical difference with a decrease of 28% compared with the mycelial growth of the control, which was greater at 48 h and increased its inhibitory effect. At



**Figura 2. Septo de *Lilium* L/A después de 96 h bajo infección inducida por cultivo axénico de *Fusarium oxysporum*. Las flechas señalan las afectaciones al tejido.**

**Figure 2. *Lilium* L/A septo after 96 h under induced infection by a *Fusarium oxysporum* axenic culture. Arrows show tissue damage.**

**Cuadro 1. Comparación de medias del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en diferentes medios adicionados con extractos vegetales al 30 %.**

**Table 1. Median comparison of *Fusarium oxysporum* mycelial growth in different mediums to which plant extracts at 30% were added.**

| Tratamiento | Crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> (mm) |      |       |       |       |       |
|-------------|--------------------------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
|             | 48 h                                                   | 96 h | 144 h | 192 h | 240 h | 288 h |
| PDA         | 1.5                                                    | 5.8  | 8.6   | 11.9  | 16.5  | 21.6  |
|             | C                                                      | C    | CD    | CD    | CB    | CB    |
| EVC         | 7.2                                                    | 12.6 | 18.9  | 23.7  | 28.2  | 31.8  |
|             | A                                                      | A    | A     | A     | A     | A     |
| EVP         | 3.2                                                    | 8.7  | 14.8  | 18.3  | 20.1  | 22.1  |
|             | BC                                                     | B    | B     | B     | B     | CB    |
| EMP         | 1.1                                                    | 4.2  | 6.3   | 9.0   | 12.5  | 15.5  |
|             | C                                                      | C    | D     | D     | C     | C     |
| ENP         | 4.9                                                    | 9.2  | 11.9  | 15.8  | 19.6  | 23.7  |
|             | BA                                                     | B    | CB    | CB    | B     | B     |
| CV          | 28.8                                                   | 10.6 | 11.8  | 9.3   | 8.1   | 12.1  |
| DMS         | 2.9                                                    | 2.4  | 4.0   | 4.1   | 4.4   | 7.8   |

\* Las medias con letras diferentes en cada columna, indican diferencia significativa al 5 % de probabilidad / medians with different letter in each column denote significant difference at 5 % probability.

Existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, siendo el extracto vegetal crudo (EVC) el tratamiento estadísticamente superior a las 48 h con un incremento del 79 % sobre el tratamiento PDA, actuando como potencializador del crecimiento micelial. En el caso del extracto medianamente polar (EMP) se presentó diferencia estadística inferior al testigo con un decremento del 27 % presentando un efecto inhibitorio bajo. A las 96 h el EVC disminuyó la proporción de crecimiento micelial, sin embargo, se mantuvo como el tratamiento que presentó diferencia superior estadística con un incremento del 54 % sobre el testigo. Por otra parte, el EMP presentó diferencia estadística inferior, con una disminución del 28 % sobre el crecimiento micelial del testigo siendo mayor a la presentada a las 48 h y aumentando su efecto inhibitorio. A las 144 h el EVC es estadísticamente superior, con un aumento del 67 % al testigo recuperando su efecto promotor del crecimiento mostrado

144 h, EVC was statistically higher with an increase of 67 % compared with the control and recovered its ability to stimulate growth that has shown 48 h earlier. However, EMP was statistically lower with a decrease of 27 % on the control's mycelial growth and maintained its inhibitory activity. At 192 h, EVC continued to be the highest but different from the control with an increase of 50 %. It should be noted that the growth stimulating activity decreases but the inhibitory effect of the EMP treatment is continuous and presents a statistically lower difference than that of the PDA treatment with a decrease of 26 %. At 240 h, EVC remains as the statistically highest treatment with a growth median of 28.167 mm but shows a difference of 41 % where the lowest kinetics of mycelial growth was obtained. On the other hand, EMP is 25 % statistically lower than the control but maintains its inhibitory activity 10 days after inoculation. At 288 h, EVC resumes its activity to stimulate growth but

48 h antes. Sin embargo, el EMP es inferior estadísticamente, 27 % menos sobre el crecimiento micelial del testigo manteniendo su actividad inhibitoria en el mismo. A las 192 h el EVC se mantuvo como el tratamiento estadísticamente superior siendo diferente al testigo con un incremento del 50 %. Cabe señalar que la actividad promotora del crecimiento se ve reducida, mientras que el efecto inhibitorio del tratamiento EMP se mantiene constante, siendo el que presenta diferencia estadística inferior al tratamiento PDA con una disminución del 26 %. A las 240 h el EVC permanece como el tratamiento superior estadísticamente con una media de crecimiento de 28.167 mm no obstante la diferencia que muestra con respecto al testigo es de 41 % en donde se obtuvo la menor cinética de crecimiento micelial. Por otra parte, el EMP es inferior estadísticamente al testigo en 25 % manteniendo estable su actividad inhibitoria 10 días después de la inoculación. A las 288 h el EVC recupera actividad para promover el crecimiento sin lograr un aumento superior al presentado a las 192 h, presentando diferencia estadística superior con un crecimiento del 51 % con respecto al testigo. En el caso del EMP se observó un aumento en la actividad inhibitoria, siendo estadísticamente diferente al testigo con un aumento del 28 %. Chávez y Aquino. (2012) señalan que el extracto vegetal de piri (Cyperus spp.) presentó un efecto inhibitorio bajo en *Fusarium* sp., utilizando concentraciones del 20 %. No obstante, estos autores mencionan que el extracto de ajo inhibió por completo el desarrollo micelial de *Fusarium* sp., este resultado coincide con lo citado por López *et al.* (2005), que en concentraciones del 5 y 10 %, el extracto de ajo inhibe el 68.5 y 69.8 % del crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, respectivamente. Por lo cual se deduce que a mayor concentración de los extractos vegetales, mayor es el efecto inhibitorio. El extracto vegetal de ortiga (*Urtica dioica*) presentó un efecto inhibitorio bajo

there is no significant increase than that at 192 h, and shows a statistically higher difference of 51 % in growth compared with the control. In the case of EMP, increased inhibitory activity was observed, being statistically different from the control with an increase of 28 %. Chávez and Aquino (2012) state that plant extracts of piri (*Cyperus* spp.) showed a low inhibitory effect in *Fusarium* sp. using 20 % concentrations. However, the authors mention that garlic extract completely inhibited *Fusarium* sp. mycelial growth. This result is in agreement with López *et al.* (2005) statement, who reported that at 5 and 10 % concentrations, garlic inhibits 68.5 and 69.8 % of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* growth, respectively. For this reason, it is assumed that the higher the concentration of plant extracts, the higher the inhibitory effect. Nettle extract (*Urtica dioica*) showed a low inhibitory effect in *Fusarium* sp. (Chávez and Aquino, 2012) in contrast with the effects observed on tests using *Colletotrichum gloeosporioides*, in which 100 % growth inhibition was observed when aqueous and alcoholic extracts of such plant were used. Based on the favorable response of EMP, we characterized and determined the organic structure of the extract using gas chromatography with a universal column and obtained the chromatogram shown in Figure 3.

In the plant extract (EMP), we found hexadecanoic acid methyl ester (Palmitic acid) and octadecadienoic acid 9,16 methyl ester (Table 2) called Omega 6 that are compounds known to have the capacity to capture free radicals and anti-inflammatory, antiallergic, antithrombotic, antimicrobial and antineoplastic activity (Kuskoski *et al.*, 2005).

The presence of phenolic compounds such as 2,4-diphenol 1,1-dimethyl, ethyl and 1,3 dioxolane 2 heptanenitrile  $\alpha$ -methyl  $\delta$ -oxo- 2- phenyl (precursor of thymol, and carvacrol and eugenol intermediary) suggest fungal activity of the plant



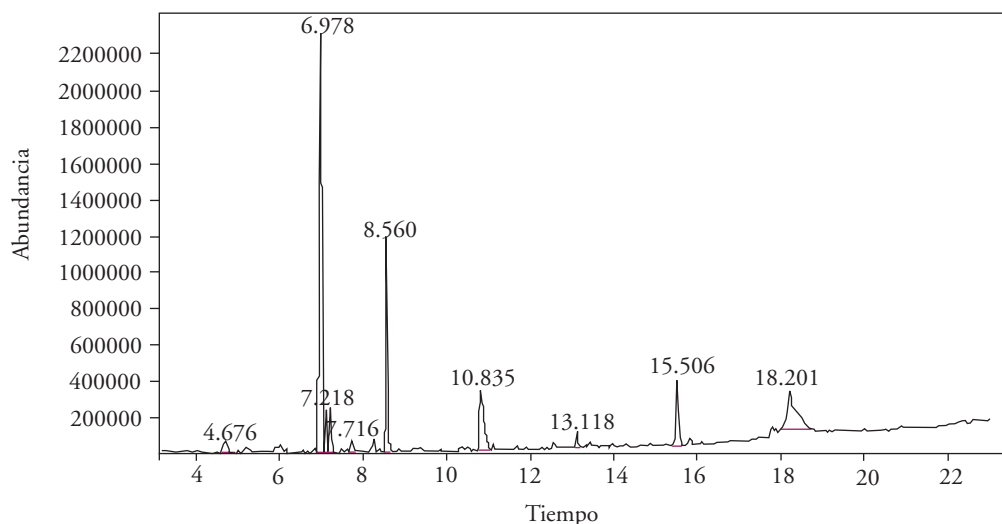
en *Fusarium* sp., (Chávez y Aquino, 2012), en contraposición a los observado en ensayos con *Colletotrichum gloeosporioides*, en los cuales se obtuvo 100 % de inhibición de crecimiento con extractos acuoso y alcohólicos de esta planta. Con base en la respuesta favorable del EMP se procedió a la caracterización y determinación de la estructura orgánica del extracto en cromatografía de gases con columna universal, obteniendo el cromatograma mostrado en la Figura 3.

En el extracto vegetal (EMP) se identificó ácido hexadecanoico metil éster (ácido palmítico) y ácido octadecadienoico 9,16 metil éster (Cuadro 2) conocido como omega 6, compuestos conocidos por su capacidad de capturar radicales libres y presentar actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas y antineoplásicas (Kuskoski *et al.*, 2005).

La presencia de los compuestos fenólicos como el 2,4-difenol 1,1-dimetil, etil y 1,3 dioxolano 2 heptanonitrilo  $\alpha$ -metil  $\delta$ -oxo- 2-fenil (precursor del timol e intermediario del carvacrol y eugenol) sugieren la actividad fungicida de los extractos vegetales,

extracts, which is favored by the acid nature of their hydroxyl group that creates a hydrogen bridge with an active enzymatic site (Kalemba and Kunicka, 2003). On the other hand, the biosynthesis of these molecules is taken either constitutively, pathogen-independent (phytoanticipins), or, if induced as part of the defense mechanism of plants against infections caused by bacteria, fungi or nematodes (phytoalexins). To this group belong flavonoids, isoflavones, aurones and phenalenes. (Tanaka *et al.*, 2002. Kalemba and Kunicka (2003) suggest that plant extracts and essential oils with phenol as the main component express the highest spectrum of antimicrobial activity.

The *Fusarium oxysporum* white fungal species was confirmed with the sequence key CM000589.1 stored in the gene bank in NCBI and based on DNA and PCR extraction protocols. The most abundant compounds (3-4 benzaldehyde dimethyl, 1,3-dioxolane-2-heptanenitrile,  $\alpha$ -methyl- $\delta$ -oxo-2- phenyl and 9,16- octadecadienoic acid, methyl ester ) in the intermediately polar plant extract (EMP) have shown fungal activity in crops



**Figura 3. Cromatograma del extracto vegetal medianamente polar (EMP) obtenido de bulbos de *Lilium*.  
Figure 3. Chromatogram of plant tissue intermediately polar (EMP) obtained from *Lilium* bulbs.**

**Cuadro 2. Compuestos obtenidos en los tiempos de retención mostrados en el cromatograma del extracto medianamente polar.****Table 2. Compounds obtained within the retention periods shown in the intermediate polar extract chromatogram.**

| Tiempo de retención | Compuesto                                            | Tiempo de retención | Compuesto                                                               |
|---------------------|------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 4.676               | Ácido valérico, 4 tridecil éster                     | 8.56                | 1,3-Dioxolano-2-heptanonitrilo, $\alpha$ -metil- $\delta$ -oxo-2-fenil- |
| 6.978               | Benzaldehído, 3-4 dimetil                            | 10.835              | Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-                                        |
| 7.098               | Biciclo [3.1.1.] hept-3-en2-ona, 4,6,6-trimetil-     | 13.118              | Metil 12-metil-tridecanoato                                             |
| 7.218               | Biciclo [3.1.1.] hept-3-en-2-one, 4,3,6-trimethyl-   | 15.506              | Ácido hexadecanoico, metil éster                                        |
| 7.716               | 2-Cyclohexen-1-ona, 3-methyl-6-(1-metil-etenil)-,(S) | 18.201              | 9,16- Ácido Octadecadienoico, metil éster                               |

la cual es favorecida por la naturaleza ácida de su grupo hidroxilo el cual forma un puente hidrógeno con un sitio activo enzimático (Kalembe y Kunicka, 2003). Por otra parte la biosíntesis de estas moléculas es llevada ya sea de manera constitutiva, patógeno-independiente (fitoanticipinas) o si es inducida como una parte de la respuesta defensiva de las plantas en contra de una infección por bacterias, hongos o nematodos (fitoalexinas) en este grupo se encuentran los flavonoides, las isoflavonas, las auronas y los fenalenones (Tanaka *et al.*, 2002; Kalembe y Kunicka (2003) sugieren que los extractos vegetales y aceites esenciales con fenol como componente principal expresan el más alto espectro de actividad antimicrobiana.

Se confirmó la especie fúngica blanco *Fusarium oxysporum* con clave de secuencia CM000589.1 del banco de genes del NCBI. Con base a los protocolos de extracción de ADN y PCR. Los compuestos de mayor abundancia en el extracto vegetal medianamente polar (EMP) 3-4 dimetil benzaldehído, 1,3-dioxolano-2-heptanonitrilo,  $\alpha$ -metil- $\delta$ -oxo-2-fenil y 9,16-ácido octadecanoico, metil éster, han reportado actividad fungicida en cultivos de interés

of interest and are potential components for further studies. The raw plant extract of *Lilium* hybrid L/A “Indian summer” bulbs presented stimulating activity in *Fusarium oxysporum* mycelial growth. The intermediate polar extract (EMP) of the bulbs presented low inhibitory activity and it is considered useful as a *Fusarium oxysporum* fungistatic.

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

agrícola siendo componentes potenciales para estudios posteriores El extracto vegetal crudo de bulbos de *Lilium* híbrido L/A “Indian summer” presentó actividad promotora del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*. El extracto medianamente polar (EMP) de los bulbos presenta actividad inhibitoria baja y se considera su utilidad como fungistático de *Fusarium oxysporum*.

LITERATURA CITADA

Alcalá de Marcano D, Vargas N, Pire A. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el cre-

- cimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Revista de la Facultad de Agronomía 22:315-323. <http://revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre-diciembre2005/d-alcala.pdf>
- Álvarez SME, Maldonado TR, García MR, Almaguer VG, Ruppit AJ, Zavala EF. 2008. Suministro de calcio en el desarrollo y nutrición de *Lilium* asiático. Agrociencia 42:881-889. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2008/nov-dic/art-3.pdf>
- Araujo D, Rodríguez D, Sanabria ME. 2007. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* causante del mal de Panamá, en algunos extractos vegetales y funguicidas. Fitopatología Venezolana 21:2-8. <http://www.ovefit.com.ve/boletines/21-1/documento1.pdf>
- Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera imperfect fungi. 4 ed. The American Phythopathological. Society Minnesota, USA. 218 p.
- Bhromsiri C, Bhromsiri A. 2010. The effect of plant growth promoting Rhizobacteria and *Arbuscular mycorrhizal* fungi on the growth, development and nutrient uptake on different vetiver ecotypes. Thai Journal of Agricultural Science 43:239-249. http://www.thaiagj.org/images/stories/Journal_online/2010/43-4/06-TJ-AGR-1010-49.pdf
- Chávez AR, Aquino AS. 2012. Control de los hongos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp y *Sclerotium* sp con extractos vegetales. Investigación Agraria 14:17-23. <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/242/228>
- Díaz JF, Vargas M, Ayvar S, Alvarado OG, Solís JF, Durán JA, Díaz HL, Hernández A. 2014. Morphological and PCR identification of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from piana pumpkin fruits and greenhouse management. Biotechnia 16:17-21. DOI:10.18633/bt.v16i3.107
- Gómez AA. 2009. La situación de las flores de corte mexicanas dentro de la política comercial internacional de México Tesis-Tecatitlán 2:1-30 <http://www.eumed.net/rev/tecsistecatl/n9/aagg.htm>
- Kalemba DF, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 10:813-829. DOI:10.2174/0929867033457719
- Keng HC, Rung YW, Keng CC, Ting FH, Ren SC. 2010. Effects of chemical and organic fertilizer on the growth, flower quality and nutrient uptake of *Anthurium andraeanum*, cultivated for cut flower production. Scientia Horticulturae 125:434441 DOI:10.1016/j.scienta.2010.04.011
- López BA, López BSR, Vásquez BME, Rodríguez HSA, Mendoza EM, Padron CE. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* schlechtend f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kunh y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. Revista Mexicana de Fitopatología 23:183-190. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>
- Ortega BR, Correa BM, Olate ME. 2006. Determinación de las curvas de acumulación de nutrientes en tres cultivares de *Lilium* spp. para flor de corte. Agrociencia 40:77-88. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2006/ene-feb/art-8.pdf>
- Rodríguez PAT, Ramírez AMA, Bautista BS, Cruz TA, Rivero D. 2012. Antifungal activity of *Acacia farnesiana* extracts on the in vitro growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Revista Científica UDO Agrícola 12:91-96. <http://udoagricola.udo.edu.ve/V12N1UDOAg/V12N1Rodriguez91.htm>
- Tanaka H, Sato M, Fujiwara S, Hirata M, Etoh H, Takeuchi H. 2002. Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology 35:494-498. DOI:10.1016/j.1472-765x.2002.01222.x
- Vinueza PSM, Crozzoli R, Perichi G. 2006. Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de plantas para control de nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. Fitopatología Venezolana 19:26-31.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: M.A., Innes, D.H., Gelfand, J.J., Sninsky, and T.J., White (eds.). PCR protocols. Pp 315-322. Academic Press. San Diego, CA.