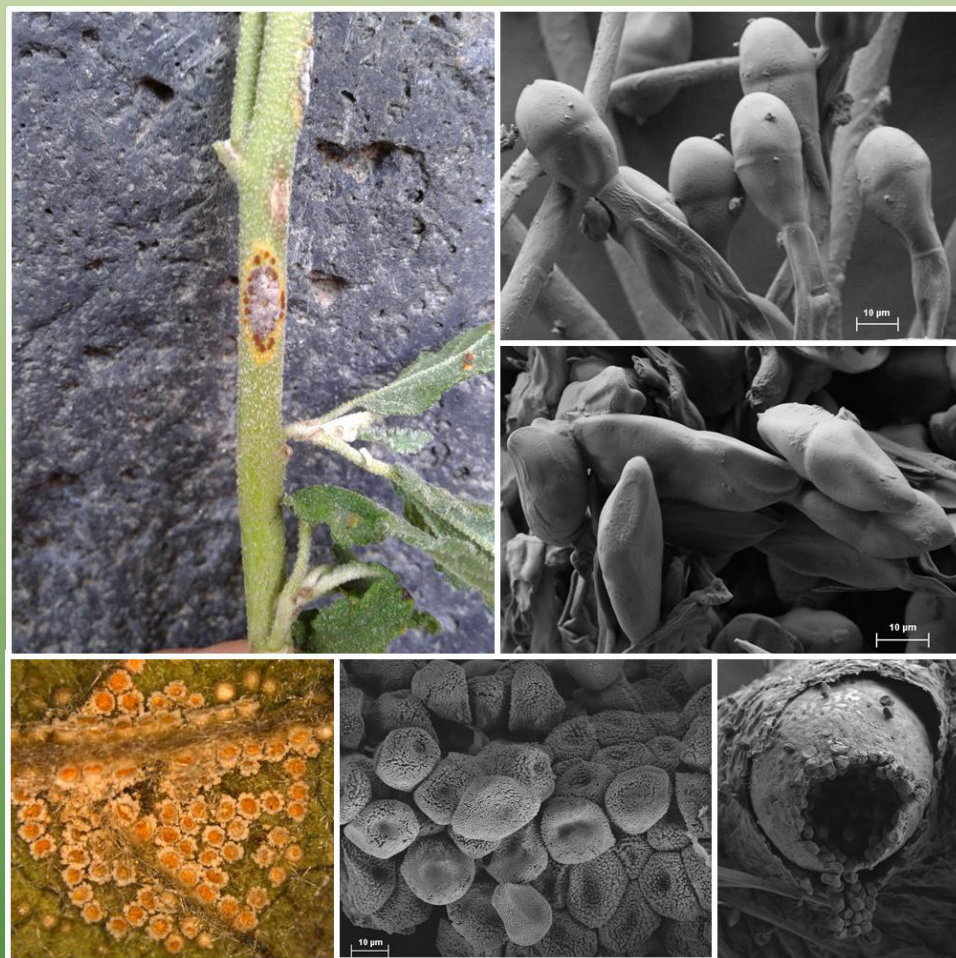


# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

VOLUMEN 41, NÚMERO 2, Mayo 2023



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

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

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

**Editora Técnica \* Technical Editor**

Dra. Norma Ávila Alistac, UACH

**Composición Web y RMFito \* Web and RMFito Composition**

M.C. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

**Editoras Adjuntas \* Senior Editors**

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

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

Dr. Vicente Febres, UF, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Rodrigo Valverde, LSU AgCenter, USA

**Editoras(es) Asociados en este Número \* Associate Editors in this Number**

Dra. Rocío Toledo Aguilar, INIFAP

Dra. Alma Rosa Solano Báez, CEPROBI, IPN

Dra. María Florencia Rodríguez García, INIFAP

Dr. Rubén Félix Gastélum, UAdeO

Dr. Gilberto Manzo Sánchez, UCOL

Dr. Luciano Martínez Bolaños, UACH

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEM

Dr. Ismael Fernando Chávez Díaz, INIFAP

Dr. Sergio de los Santos Villalobos, ITSON

Dr. José Joaquín Velázquez Monreal, INIFAP

Dr. Guillermo Márquez Licona, CEPROBI, IPN

---

**Portada:** Síntomas y signos inducidos por *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia* (Superior e inferior izquierda). Microscopía electrónica de barrido de Teliosporas (Superior derecha y centro), Eciosporas (Inferior centro) y Ecios (Inferior derecha).

**Original:** Leal-León I, Moreno-Velázquez M, Sánchez-Pale JR and Quezada-Salinas A.  
Página: 261-263.

**SCIENTIFIC ARTICLES \* ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

- Antagonistic bacteria against *Fusarium* spp. isolated from sclerotia of *Claviceps gigantea* in maize (*Zea mays*)** \* Bacterias antagonistas contra *Fusarium* spp. aisladas de esclerocios de *Claviceps gigantea* en maíz (*Zea mays*). 143  
Ayala-Torres AM, Aranda-Ocampo S, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Sánchez-Pale JR.
- Neopestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum karstii*, causal agents of leaf spots on camedor palm (*Chamaedorea quezalteca*) in Mexico** \* *Neopestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum karstii* agentes causales de manchas foliares en palma camedor (*Chamaedorea quezalteca*) en México. 165  
Sarmiento-Chacón M, Hernández-García V, Rodríguez-Larramendi LA, Salas-Marina MA and Ríos-Velasco C.
- Morpho-molecular identification of the causal agent of avocado scab in Michoacán** \* Identificación morfo-molecular del agente causal de la roña del aguacate en Michoacán. 182  
Morales-García JL, Isabel López-Cornejo CI, Pedraza-Santos ME, Chávez-Bárceñas AT, Esquivel-Miguel E, García-Morales S and Pineda-Guillermo S.

**REVIEW ARTICLES \* ARTÍCULOS DE REVISIÓN**

- Effectors: key actors in phytopathology** \* Efectores: actores claves en la fitopatología. 203  
Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Couoh-Dzul OJ, de los Santos-Briones C and Blondy Canto-Canché

**PHYTOPATHOLOGICAL NOTES \* NOTAS FITOPATOLÓGICAS**

- Identification and characterization of microsatellites in isolates of *Peronospora tabacina* collected in tobacco-producing states of Mexico** \* Identificación y caracterización de microsatélites en aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en estados productores de tabaco de México. 229  
Ramos-Barraza YM, Cruz-Lachica I, Tovar-Pedraza JM, Valdez-Torres JB, Márquez-Zequera I, Osuna-García LA, Gómez-González G and García-Estrada RS.
- Fungi associated with the decline and death of *Phoenix canariensis* in Mexico City** \* Hongos asociados a la declinación y muerte de *Phoenix canariensis* en la Ciudad de México 241  
Quezada-Salinas A, García-Díaz SE, Almaraz-Sánchez A, Alvarado-Rosales D, Saavedra-Romero LdeL, Aranda-Ocampo S, Fredy-Ortiz C and Equihua-Martínez A.

**Identification of *Puccinia sherardiana* in *Sphaeralcea angustifolia* in Mexico State \*** 257  
Identificación de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia* en el Estado de México.  
Leal-León I, Moreno-Velázquez M, Sánchez-Pale JR and Quezada-Salinas A.

**Isolation and identification of antagonistic fungi of fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico \*** 268  
Aislamiento e identificación de hongos antagonistas de hongos asociados a la marchitez del chile en el sur de Guanajuato, México.  
Martínez-Martínez TO, Martínez-Camacho AP, Rodríguez-Guerra R, Mariscal-Amaro LA and Rivas-Valencia P.

**Evaluation of resistance to *Fusarium* wilt race 1 in new banana clones \*** 285  
Evaluación de la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1 en nuevos clones de banano.  
García-Velasco R, Ventura-Martín JdLC, Lorenzo-Feijoo JC, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Rodríguez-García A and Companioni-González B.

**PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS \* REPORTES FITOPATOLÓGICOS**

***Diaporthe* sp. and *Lasiodiplodia* sp.: New foliar pathogens in cuajinicuil and soursop in Oaxaca, Mexico \*** 298  
*Diaporthe* sp. y *Lasiodiplodia* sp.: nuevos patógenos foliares de cuajinicuil y guanábana en Oaxaca, México.  
Castillo-Cabrera J, González-Escobedo R, Bautista-Hernández N, Barrios-Bautista JL, Ávila-Quezada GD and Muñoz-Castellanos LN.

**First occurrence of *Dasheen mosaic virus* (DsMV) in *Xanthosoma riedelianum* (Mangarito) in Brazil \*** 310  
Primera ocurrencia del *Dasheen mosaic virus* (DsMV) en *Xanthosoma riedelianum* (Mangarito) en Brasil.  
Colariccio A, Ramos AdeF, Rodrigues CAL, Lembo DLM, Harakava R, Azevedo FJA and Kitajima EW.

# Antagonistic bacteria against *Fusarium* spp. isolated from sclerotia of *Claviceps gigantea* in maize (*Zea mays*)

## Bacterias antagonistas contra *Fusarium* spp. aisladas de esclerocios de *Claviceps gigantea* en maíz (*Zea mays*)

Ana María Ayala-Torres, Sergio Aranda-Ocampo\*, Carlos De León-García de Alba, Cristian Nava-Díaz, Postgrado en Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; Jesús Ricardo Sánchez-Pale, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo carretera Toluca-Ixtlahuaca km. 15.5, Piedras Blancas 50200, Toluca de Lerdo, México.

\*Corresponding autor: arandasergio63@gmail.com

Received: August 03, 2022.

Accepted: March 25, 2023.

Ayala-Torres AM, Aranda-Ocampo S, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Sánchez-Pale JR. 2023. Antagonistic bacteria against *Fusarium* spp. isolated from sclerotia of *Claviceps gigantea* in maize (*Zea mays*). Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 143-164

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2208-2>

First DOI publication: April 14, 2023.

Primera publicación DOI: 14 de Abril, 2023.

**Abstract.** Fungal sclerotia house native bacterial populations of interest for biological control of plant pathogenic fungi. The objectives of this research were: i) to explore the bacterial populations associated with *Claviceps gigantea* sclerotia in maize from six locations in the State of Mexico, ii) to evaluate the *in vitro* antagonism of these bacterial populations against three species of *Fusarium* phytopathogens of maize, iii) to

**Resumen.** Los esclerocios de algunos hongos albergan bacterias nativas para el control biológico de hongos fitopatógenos. Los objetivos de esta investigación fueron: i) explorar poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea* en maíces de seis localidades del Estado de México, ii) evaluar el antagonismo *in vitro* de estas poblaciones bacterianas contra tres especies de *Fusarium* fitopatógenos de maíz, iii) identificar molecularmente los antagonistas más eficientes y caracterizar la producción de metabolitos *in vitro*. Poblaciones bacterianas en los esclerocios se calcularon por conteo directo en placa; el antagonismo *in vitro* contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* se evaluó por confrontación en medio Waksman agar. Las bacterias antagonistas se identificaron por secuenciación parcial del gen 16S rRNA y se evaluaron *in vitro* para la producción de ácido indol-3-acético, sideróforos, actividad lipolítica, proteolítica y solubilización de fosfato mineral. La densidad bacteriana estuvo entre

molecularly identify the more efficient antagonists and characterize the *in vitro* production of metabolites. Bacterial populations in the sclerotia were calculated by direct plate count; *in vitro* antagonism against *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides* was evaluated by confrontation in Waksman agar medium. Antagonistic bacteria were identified by partial sequencing of 16S rRNA gene and evaluated *in vitro* for the production of indole-3 acetic acid, siderophores, lipolytic and proteolytic activity, and mineral phosphate solubilization. The bacterial density ranged from 2.023 to 2.397 Log<sub>10</sub>UFC g<sup>-1</sup> of sclerotia. Twenty-two strains showed *in vitro* antagonism against at least one *Fusarium* species and were identified as members of the genera *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus*, and *Stenotrophomonas*. The 22 antagonists showed *in vitro* lipolytic, proteolytic, siderophore-producing and phosphate-solubilizing activity; only 12 (55%) produced indole-3-acetic acid. *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) strains were antagonists against the three *Fusarium* species and produced all the metabolites evaluated.

**Key words:** Ear rot, *Bacillus*, *Pseudomonas*, inhibition, metabolites.

*Zea mays*, commonly known as corn, is the most widely produced cereal crop worldwide, with wheat and rice following as close contenders (CIMMYT, 2019). It is worth noting that Mexico is considered the center of origin for corn (Matsuoka *et al.*, 2002) and has the largest annual planted area and per capita consumption of this crop (García-López and Giraldo, 2021; Padrón *et al.*, 2013). However, Mexico's corn production and grain

2.023 a 2.397 Log<sub>10</sub>UFC g<sup>-1</sup> de esclerocio. Veintidos cepas mostraron antagonismo *in vitro* contra al menos una especie de *Fusarium*. Se identificaron como miembros de los géneros *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*. Los 22 antagonistas mostraron *in vitro* actividad lipolítica, proteolítica, produjeron sideróforos y solubilizaron fosfato; únicamente 12 (55%) produjeron ácido indol-3-acético. Las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron todos los metabolitos evaluados.

**Palabras clave:** Pudrición de mazorca, *Bacillus*, *Pseudomonas*, inhibición, metabolitos.

El maíz (*Zea mays*) es el cereal más producido en el mundo, seguido de trigo y arroz (CIMMYT, 2019). México es el centro de origen del maíz (Matsuoka *et al.*, 2002), además de ser el cultivo con la mayor superficie anual sembrada y consumo per cápita (García-López y Giraldo, 2021; Padrón *et al.*, 2013). En México se estima que la producción y calidad de grano de este cultivo es afectado por diversas enfermedades fúngicas, destacando las enfermedades de pudrición de la mazorca (Moreno-Limón *et al.*, 2011).

El hongo *Fusarium* causa pudriciones de mazorca que representa una limitante en la producción e inocuidad del maíz a nivel mundial. Se consigna que la mayoría de los híbridos de maíz cultivados en el mundo son susceptibles a más de 10 especies de *Fusarium* que causan pudrición de la mazorca (Mesterhazy *et al.*, 2012). La mayoría de estas especies de *Fusarium* producen micotoxinas que afectan la salud no solo de animales sino también de los seres humanos (Holf, 2020; Mielniczuk

quality are often compromised by several fungal diseases, among which corn ear rot diseases are particularly prevalent (Moreno-Limón *et al.*, 2011).

*Fusarium* fungi cause corn ear rot, which poses a significant limitation on the production and safety of corn worldwide. It is reported that most corn hybrids cultivated globally are susceptible to more than 10 *Fusarium* species causing ear rot (Mesterhazy *et al.*, 2012). These species typically produce mycotoxins that affect not only animal health but also human health (Holf, 2020; Mielniczuk and Skwaryło-Bednarz, 2020). In Mexico, *F. verticillioides* is the most widely distributed and important species causing ear rot in the states of Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Puebla, and Nuevo Leon. Additionally, *F. graminearum* and *F. subglutinans* have also been reported to cause ear rot in the states of Mexico, Michoacan, and Yucatan (Zenteno-Zevada, 1963).

Biocontrol of plant diseases with antagonistic microorganisms is a useful strategy to reduce the use of pesticides in agriculture and lower production costs and environmental impact (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán and Santoyo 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Previous studies have shown that exudates from the sclerotia of phytopathogenic fungi such as *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum* stimulate the growth of specific bacterial populations in the same agroecosystem with greater antifungal activity against these same fungi, compared to bacterial strains isolated from other ecological niches (Abdullah *et al.*, 2008; Coley-Smith and Dickenson, 1971; Gilbert and Linderman, 1971; Hou *et al.*, 2006). Bacterial populations that coexist in specific habitats with limited nutrients, such as sclerotia, promote the production of metabolites that increase their ability to compete against other microorganisms. Therefore, sclerotia of fungi are considered potential natural reservoirs of

and Skwaryło-Bednarz, 2020). En México, se reporta a *F. verticillioides* como la especie de mayor distribución y más importante por causar pudriciones en mazorca en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Puebla y Nuevo León. También se han reportado a *F. graminearum* y *F. subglutinans* causando pudriciones en mazorca en los estados de México, Michoacán y Yucatán (Zenteno-Zevada, 1963).

El biocontrol de enfermedades en plantas con microorganismos antagonistas es una estrategia útil para aminorar el uso de plaguicidas en la agricultura y disminuir costos de producción e impacto ambiental (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán y Santoyo 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Investigaciones previas han demostrado que los exudados en los esclerocios de hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* estimulan el crecimiento de poblaciones bacterianas específicas en el mismo agroecosistema con mayor actividad antifúngica hacia estos mismos hongos, que cepas bacterianas aisladas de otros nichos ecológicos (Abdullah *et al.*, 2008; Coley-Smith y Dickenson, 1971; Gilbert y Linderman, 1971; Hou *et al.*, 2006). Las poblaciones bacterianas que coexisten en hábitats específicos con escasos nutrientes, como es el caso de los esclerocios, promueven la producción de metabolitos que incrementan su capacidad de competencia contra otros microorganismos; por lo tanto, se considera que los esclerocios de hongos son potenciales reservorios naturales de antagonistas eficientes para el control biológico de fitopatógenos (Hou *et al.*, 2006; Zachow *et al.*, 2011).

El ascomiceto *Claviceps gigantea* causa la enfermedad “diente de caballo” así llamada por la forma de los esclerocios. Este hongo produce alcaloides principalmente ergolina, festuclavina, dihydroelymoclavina, chanoclavina y elimoclavina (Agurell *et al.*, 1963; Solano-Báez *et al.*, 2018) que

efficient antagonists for the biological control of phytopathogens (Hou *et al.*, 2006; Zachow *et al.*, 2011).

*Claviceps gigantea*, an ascomycete, causes the disease commonly known as “horse’s tooth” due to the shape of its sclerotia. This fungus produces several alkaloids, mainly ergoline, festuclavine, dihydroelymoclavine, chanoclavine, and elimoclavine, which are also toxic to both animals and humans (Aguirell *et al.*, 1963; Solano-Báez *et al.*, 2018; Mielniczuk and Skwaryło-Bednarz, 2020; Bragg *et al.*, 2017; Hof, 2020). *C. gigantea* is an endemic fungus limited geographically to locations in Mexico with altitudes above 1800 masl and relative humidity  $\geq 60\%$  (Fucikovsky and Moreno, 1976; Fuentes *et al.*, 1964; Ullstrup, 1973). In the high valleys of Mexico ( $>2000$  masl), maize is grown in environments with temperate climates, where ear rots caused by *Fusarium* spp. are common, often occurring simultaneously with *C. gigantea*, causing losses of up to 100% (CIMMYT, 2004). In this study, we hypothesize that *C. gigantea* sclerotia harbor bacterial populations with efficient antagonism against *Fusarium* species causing maize ear rot in Mexico. Our objectives were to: i) explore the bacterial populations associated with *C. gigantea* sclerotia in the State of Mexico, ii) evaluate the *in vitro* antagonism of these bacterial populations against *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides*, iii) molecularly identify the most efficient antagonists and characterize the *in vitro* production of their metabolites.

## MATERIALS AND METHODS

### Collecting *Claviceps gigantea* sclerotia

Sclerotia of *C. gigantea* were collected from six localities in the State of Mexico, which showed

también son tóxicos para animales y seres humanos (Mielniczuk y Skwaryło-Bednarz, 2020; Bragg *et al.*, 2017; Hof, 2020). *C. gigantea* es un hongo endémico, geográficamente limitado a localidades en México con altitudes mayores a los 1800 msnm y humedad relativa  $\geq 60\%$  (Fucikovsky y Moreno, 1976; Fuentes *et al.*, 1964; Ullstrup, 1973). En los valles altos de México ( $>2000$  msnm), el maíz se cultiva en ambientes con climas templados en donde las pudriciones de mazorca causadas por *Fusarium* spp. son comunes en infecciones simultáneas con *C. gigantea* causando pérdidas de hasta el 100% (CIMMYT, 2004). En el presente estudio, se infiere que los esclerocios de *C. gigantea* albergan poblaciones bacterianas con antagonismo eficiente contra especies de *Fusarium* que causan la pudrición de mazorca de maíz en México. Los objetivos de esta investigación fueron: i) explorar las poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios de *C. gigantea* en el Estado de México, ii) evaluar el antagonismo *in vitro* de estas poblaciones bacterianas contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, iii) identificar molecularmente los antagonistas más eficientes y caracterizar la producción *in vitro* de metabolitos de los antagonistas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de esclerocios de *Claviceps gigantea*

Los esclerocios de *C. gigantea* se colectaron en seis localidades del Estado de México con historial severo en condiciones naturales de las enfermedades diente de caballo y pudriciones de mazorca causados por *Fusarium* spp. (Cuadro 1; Figura 1). Los esclerocios de cada localidad se colectaron de mazorcas infectadas con *C. gigantea* sin síntomas de pudrición por *Fusarium* spp.



severe history under natural conditions of “horse tooth” disease and ear rot caused by *Fusarium* spp. (see Table 1 and Figure 1). For each locality, sclerotia were collected from *C. gigantea*-infected ears without symptoms of rot caused by *Fusarium* spp.

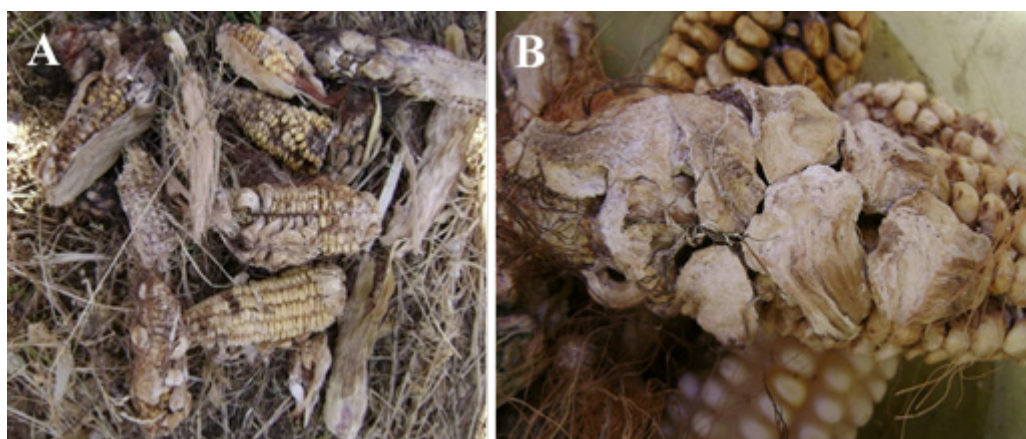
### Aislamiento de bacterias de esclerocios de *Claviceps gigantea*

Se colectaron 10 esclerocios de *C. gigantea* en cada localidad. El tamaño de muestra del número de esclerocios se calculó con el modelo descrito

**Table 1. Collection of *C. gigantea* sclerotia in localities of the State of Mexico.**  
**Cuadro 1. Colecta de esclerocios de *C. gigantea* en localidades del Estado de México.**

<sup>1</sup> Localidad	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)
Almoloya de Juárez	19° 14' 10"	90° 42' 07"	2600
Atacomulco	19° 43' 37"	99° 42' 12"	2700
Calimaya	19° 10' 25"	99° 32' 12"	2680
Mina México	19° 40' 35"	99° 40' 10"	2580
Toluca	18° 59' 00"	99° 40' 58"	2600
Villa Victoria	19° 26' 00"	100° 00' 00"	2570

<sup>2</sup>Sample size of 10 sclerotia per locality estimated with Cochran's model (1982). / <sup>2</sup>Tamaño de muestra de 10 esclerocios por localidad estimado con el modelo de Cochran (1982).



**Figure 1. A) Corn ears with simultaneous infection of *Claviceps gigantea* and *Fusarium* spp. B) *Claviceps gigantea* sclerotia on corn ears.**

**Figura 1. A) Mazorcas de maíz con infección simultánea de *Claviceps gigantea* y *Fusarium* spp. B) Esclerocios de *C. gigantea* en mazorcas de maíz.**

### Isolation of bacteria from *Claviceps gigantea* sclerotia

Ten sclerotia of *Claviceps gigantea* were collected from each of the six locations. The sample

por Cochran (1982). Los esclerocios (n=10) de cada localidad se molieron por separado en un mortero estéril; de aquí, se utilizó 1 g de esclerocios molidos diluido en 100 mL de agua destilada estéril para realizar diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$ ; de cada

size for the number of sclerotia was determined using the model described by Cochran (1982). The sclerotia (n=10) from each location were ground separately in a sterile mortar. One gram of ground sclerotia was diluted in 100 mL of sterile distilled water to perform serial dilutions up to  $10^{-4}$ . From each dilution, 100  $\mu$ L was plated on Petri dishes with R2A culture medium (Difco) in triplicate and incubated at 28 °C for 24 h. Bacterial growth was quantified using the direct plate count method, and microbial density was expressed in  $\text{Log}_{10}$  CFU  $\text{g}^{-1}$  of sclerotium (Peng *et al.*, 2009). A total of 129 bacterial isolates associated with sclerotia, exhibiting different colony morphology observed under a stereoscopic microscope (American Optical AO), were selected from the six sampled locations for further study of *in vitro* antagonism.

#### ***In vitro* antagonism against *Fusarium* spp.**

The *in vitro* antagonism of 129 bacterial strains was evaluated against three *Fusarium* species (*F. graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides*) responsible for ear rot in the sampled locations. The pathogenicity of these strains was experimentally verified in seedlings of three native populations of corn in the State of Mexico by inoculating the fungus in the substrate. The internal regions ITS of the rRNA 18S-5.8S and 5.8S-28S genes were molecularly identified through amplification, provided by Dr. Dolores Briones Reyes from the Graduate Program of Genetic Resources and Productivity of the Colegio de Postgraduados. *In vitro* antagonism was evaluated by dual confrontation on square Petri dishes (120 x 120 mm) with Waksman agar culture medium, which was selected from King's B media, R2A, nutrient agar, and potato-dextrose agar, as it allowed optimal growth of both *Fusarium* species and bacterial isolates. The initial

dilución se sembraron 100  $\mu$ L en placas Petri con medio de cultivo R2A (Difco) con tres repeticiones y se incubaron a 28 °C por 24 h. Del crecimiento bacteriano se cuantificó el número de colonias por el método de conteo directo en placa. La densidad microbiana se expresó en  $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de esclerocio (Peng *et al.*, 2009). Entre las seis localidades muestreadas, se seleccionaron 129 aislados bacterianos asociados a los esclerocios con diferente morfología de la colonia observada en un microscopio estereoscópico (American Optical AO) para el estudio posterior de antagonismo *in vitro*.

#### **Antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp.**

Se evaluó el antagonismo *in vitro* de 129 cepas bacterianas contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* que causan pudrición de mazorca en las localidades muestreadas; la patogenicidad de estas cepas se evidenció experimentalmente en plántulas de tres poblaciones nativas de maíz en el Estado de México por inoculación del hongo en sustrato y se identificaron molecularmente por amplificación de las regiones internas ITS de los genes rRNA 18S-5.8S y 5.8S-28S las cuales fueron donadas por la Dra. Dolores Briones Reyes del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, del Colegio de Postgraduados. El antagonismo *in vitro* se evaluó por confrontación dual en placas Petri cuadradas (120 x 120 mm) con medio de cultivo Waksman agar seleccionado entre los medios B de King, R2A, agar nutritivo y papa-dextrosa agar por ser el que permitió el óptimo crecimiento tanto de *Fusarium* spp. como de los aislados bacterianos. Inicialmente, las cepas de *Fusarium* spp. se inocularon por extensión con un asa L-digralsky sobre la superficie del medio de cultivo con 300  $\mu$ L de una suspensión acuosa con  $1.8 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  cuantificados en una Cámara Neubauer de cada especie con cinco días a 28 °C en

inoculation of *Fusarium* species strains was carried out by extension with an L-digralsky loop on the culture medium surface, and the inoculated Petri dishes were kept at room temperature for 60 min. Bacteria (n=129) were subsequently inoculated with a multi-point inoculator (Boekel®, 96-point microplate replicator) and incubated at 28 °C for 7 days. Bacterial strains that showed antagonism (inhibition halo of fungal growth) against one or more *Fusarium* species were selected. In another assay, antagonistic bacterial strains were individually inoculated by puncturing the bacterial mass with a sterile stick under the same experimental conditions as the previous assay. Only bacterial strains that showed antagonism by forming an inhibition halo  $\geq 5$ mm of mycelial growth against one, two, or all three evaluated *Fusarium* species were selected. Daily observations were made, and the assay was repeated three times. Controls consisted of Petri dishes with growth of *Fusarium* species in the absence of antagonistic bacteria.

### Qualitative detection of metabolite production

The antagonistic bacteria were qualitatively characterized for their ability to produce metabolites *in vitro*, such as indole-3-acetic acid, using soy tryptone broth (TSB) as the culture medium. Bacterial strains that produced a reddish coloration in the medium were considered positive (Frey-Klett *et al.*, 2005), while siderophores were assessed using the universal medium chrome azurol S (CAS), with bacterial strains that evidenced a yellow halo around the colony being considered positive (Schwyn and Neilands, 1987). Lipolytic and proteolytic activities were evaluated using nutrient agar supplemented with Tween 80 and TSB medium supplemented with skimmed milk, respectively. Bacterial strains that evidenced an opaque and clear halo around the colony were

medio Waksman agar (1 L) (agar 20 g, glucosa 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g, peptona 5.0 g, pH 6.8). Las placas de Petri inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente por 60 min; en seguida, las bacterias (n=129) se inocularon con un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator 96 puntos) y se incubaron a 28 °C por 7 días; de aquí, se seleccionaron las cepas bacterianas que evidenciaron antagonismo (halo de inhibición del crecimiento fúngico) contra una o más especies de *Fusarium*. Posteriormente, en otro ensayo las cepas bacterianas antagonistas se sembraron individualmente por punción de masa bacteriana con un palillo estéril bajo las mismas condiciones experimentales del ensayo anterior. Se realizaron observaciones diarias y se seleccionaron únicamente las cepas bacterianas que mostraron antagonismo evidenciado por la formación de un halo de inhibición  $\geq 5$ mm del crecimiento del micelio contra una, dos o las tres especies de *Fusarium* evaluadas. El ensayo se repitió tres veces. Los testigos consistieron en placas de Petri con crecimiento de las especies de *Fusarium* en ausencia de las bacterias antagonistas.

### Detección cualitativa de la producción de metabolitos

Las bacterias antagonistas se caracterizaron cualitativamente en cuanto a su capacidad para producir metabolitos *in vitro* como el ácido indol-3-acético en el medio de cultivo caldo soja triptona (TSB); se consideraron positivas las cepas bacterianas que produjeron una coloración rojiza en el medio (Frey-Klett *et al.*, 2005) y sideróforos en el medio universal cromo azurol S (CAS) considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo amarillo alrededor de la colonia (Schwyn and Neilands, 1987); actividad lipolítica en el medio agar nutritivo suplementado con Tween 80 y proteolítica en el medio TSB suplementado con leche

considered positive for lipolytic and proteolytic activities (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). Mineral phosphate solubilization was assessed using TCP medium, with bacterial strains that evidenced an opaque halo around the colony being considered positive (El-Yazeid *et al.*, 2007). All evaluations were performed in triplicate.

### **Molecular identification of antagonistic bacteria**

The DNA of the potential antagonists was obtained from individual colonies with 72 h of growth at 28 °C on Waksman agar medium using the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Partial amplification of the 16S rRNA gene was carried out using the primers 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') and 1492R (3' GGTTACCTTGTTACGACTT 5') and PCR conditions described by Baker *et al.* (2003). The amplified products were sequenced (Sanger sequencing) at MacroGen Inc. (Seoul, Korea) (<https://www.macrogen.com>); the sequences were compared in the gene bank (GenBank) of the International Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) using the Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ algorithm (Altschul *et al.*, 1990).

## **RESULTS**

### **Bacterial population density in *Claviceps gigantea* sclerotia**

The study revealed bacterial growth in R2A culture medium obtained from sclerotia at all sampling locations. Colony counting was performed to determine bacterial density in *C. gigantea* sclerotia, which varied from 2.023 to

descremada, considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo opaco y claro alrededor de la colonia respectivamente (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007), y solubilización de fosfato mineral en el medio TCP, considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo opaco alrededor de la colonia (El-Yazeid *et al.*, 2007). Todas las evaluaciones se hicieron por triplicado.

### **Identificación molecular de las bacterias antagonistas**

El ADN de los antagonistas potenciales se obtuvo de colonias individuales con 72 h de crecimiento a 28 °C en medio Waksman agar con el kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación parcial del gen 16S rRNA se realizó con los iniciadores 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (3' GGTTACCTTGTTACGACTT 5') y las condiciones de PCR descritas por Baker *et al.* (2003). Los productos amplificados se secuenciaron (secuenciación Sanger) en MacroGen Inc. (Seul, Korea) (<https://www.macrogen.com>); las secuencias se compararon en el banco de genes (GenBank) del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) empleando el algoritmo Blast<sub>n</sub> (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1990).

## **RESULTADOS**

### **Densidad de poblaciones bacterianas en esclerocios de *Claviceps gigantea***

Se observó crecimiento bacteriano en medio de cultivo R2A de los esclerocios provenientes de

2.397 Log<sub>10</sub>CFU g<sup>-1</sup> of sclerotium across the six sampling sites (Table 2). Notably, the highest bacterial density was found in Atlacomulco lots (2.397) and the lowest in Villa Victoria (2.023) Log<sub>10</sub>CFU g<sup>-1</sup> of sclerotium. These findings imply the presence of bacterial populations associated with *C. gigantea* sclerotia exudates. Nevertheless, further research is required to investigate factors that influence bacterial density and structure in this ecological niche.

todas las localidades muestreadas. Del crecimiento bacteriano se cuantificó el número de colonias por el método de conteo directo en placa y la densidad bacteriana en esclerocios de *C. gigantea* fue diferente entre las seis localidades muestreadas en rangos desde 2.023 hasta 2.397 Log<sub>10</sub>UFC g<sup>-1</sup> de esclerocio (Cuadro 2). La mayor densidad bacteriana se registró en los lotes de Atlacomulco (2.397) y la menor en Villa Victoria (2.023) Log<sub>10</sub>UFC g<sup>-1</sup> de esclerocio respectivamente. Lo anterior sugiere

**Table 2. Bacterial density (Log<sub>10</sub>UFC g<sup>-1</sup>) in *C. gigantea* sclerotia by sampling location.**

**Cuadro 2. Densidad bacteriana (Log<sub>10</sub>UFC g<sup>-1</sup>) en esclerocios de *C. gigantea* por localidad de muestreo.**

Localidad	Número de colonias	Log <sub>10</sub> UFC g <sup>-1</sup> de esclerocio
Almoloya de Juárez	<sup>z</sup> 204.1	2.309
Atlacomulco	249.9	2.397
Calimaya	188.8	2.276
Mina México	200.4	2.301
Toluca	133.6	2.125
Villa Victoria	105.6	2.023

<sup>z</sup> Average number of colonies isolated from 10 *C. gigantea* sclerotia per location sampled by direct plate count on R2A medium with three replicates. / <sup>z</sup> Promedio del número de colonias aisladas de 10 esclerocios de *C. gigantea* por localidad muestreada mediante conteo directo en placa en medio R2A con tres repeticiones.

### ***In vitro* antagonism against *Fusarium* spp.**

Out of 129 morphologically different bacterial strains isolated from sclerotia, 22 (17%) were identified by their *in vitro* antagonism (inhibition halo of fungal growth  $\geq$  5 mm) against one or more species of *Fusarium* (Table 3). Among these, 13 bacterial strains (59%) were isolated from the Atlacomulco location, and three strains (13%) from each of the Calimaya, Mina, and Toluca locations. Among the antagonists (n=22), 10 (45%) strains were antagonistic to *F. verticillioides*, 14 (63%) to *F. subglutinans*, and 17 (81%) to *F. graminearum*.

que existen poblaciones bacterianas asociadas a los exudados de los esclerocios de *C. gigantea*; sin embargo, es necesario profundizar más en investigaciones que evidencien los factores que influyen la densidad y estructura bacteriana en este nicho ecológico.

### **Antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp.**

De 129 cepas bacterianas morfológicamente diferentes aisladas de esclerocios, 22 (17%) se identificaron por su antagonismo *in vitro* (halo de inhibición del crecimiento fúngico  $\geq$  5 mm) contra una o más especies de *Fusarium* (Cuadro 3). Entre

**Table 3. Molecular identification, origin, antagonism against *Fusarium* spp. and metabolite production of 22 antagonistic strains isolated from sclerotia of *Claviceps gigantea*.**

**Cuadro 3. Identificación molecular, origen, antagonismo contra *Fusarium* spp. y producción de metabolitos de 22 cepas antagonistas aisladas de esclerocios de *Claviceps gigantea*.**

ID cepa	Localidad	Identificación por secuenciación parcial del gen 16S rRNA	No. acceso de secuencias tipo de la especie (NCBI)	% de identidad	Antagonismo <i>in vitro</i>			Producción de metabolitos <i>in vitro</i>				
					<sup>2</sup> Fg	Fs	Fv	AIA	LIP	PRO	SID	SFM
BA1	Atzacmulco	<i>Bacillus subtilis</i>	KF021537.1	99.39	+	+	+	+	+	+	+	+
BA2	Atzacmulco	<i>Pseudomonas syringae</i>	NR_043716.1	99.28	+	+	+	+	+	+	+	+
BA3	Atzacmulco	<i>Delftia lacustris</i>	KF054933.1	99.46	+	-	+	-	+	+	+	+
BA4	Mina	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913974.1	99.40	+	-	+	-	+	+	+	+
BA5	Calimaya	<i>Delftia acidovorans</i>	EF564190.1	99.38	+	-	+	-	+	+	+	+
BA6	Calimaya	<i>Sphingobacterium</i> sp.	KF777439.1	99.41	+	-	-	-	+	+	+	+
BA7	Atzacmulco	<i>Pseudomonas geniculata</i>	JX042457.1	99.44	+	-	-	-	+	+	+	+
BA8	Mina	<i>Micromonospora</i> sp.	KY015111.1	99.44	-	+	-	-	+	+	+	+
BA9	Mina	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FJ859699.1	99.37	-	+	-	-	+	+	+	+
BA10	Calimaya	<i>Staphylococcus aureus</i>	LN929738.1	99.49	+	+	-	-	+	+	+	+
BA11	Atzacmulco	<i>Pseudomonas putida</i>	KC582298.1	99.05	+	+	-	+	+	+	+	+
BA12	Toluca	<i>Bacillus</i> sp.	HM032893.1	99.48	+	+	-	+	+	+	+	+
BA13	Atzacmulco	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GU198115.1	99.47	+	+	-	+	+	+	+	+
BA14	Atzacmulco	<i>Bacillus subtilis</i>	KF527828.1	99.35	+	+	-	-	+	+	+	+
BA15	Atzacmulco	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KC494392.1	99.02	+	+	-	+	+	+	+	+
BA16	Atzacmulco	<i>Pseudomonas putida</i>	KC582298.1	99.16	+	+	-	+	+	+	+	+
BA17	Atzacmulco	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GU198113.1	99.40	-	+	-	+	+	+	+	+
BA18	Atzacmulco	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MH781489.1	99.02	+	+	+	+	+	+	+	+
BA19	Atzacmulco	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ991143.2	99.05	-	+	+	-	+	+	+	+
BA20	Toluca	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MF765339.1	99.48	+	-	+	+	+	+	+	+
BA21	Atzacmulco	<i>Pseudomonas putida</i>	JX120503.1	99.15	+	-	+	+	+	+	+	+
BA22	Toluca	<i>Bacillus</i> sp.	MF510169.1	99.48	-	-	+	+	+	+	+	+

<sup>2</sup>Fg= *Fusarium graminearum*; Fs=*Fusarium subglutinans*; Fv=*Fusarium verticillioides*; IAA=indole-3-acetic acid production; LIP= lipolytic activity; PRO= proteolytic activity; SID= siderophore production; SFM= mineral phosphate solubilization. / <sup>2</sup>Fg= *Fusarium graminearum*; Fs=*Fusarium subglutinans*; Fv=*Fusarium verticillioides*; AIA = producción de ácido indol-3-acético; LIP= actividad lipolítica; PRO= actividad proteolítica; SID= producción de sideróforos; SFM= solubilización de fosfato mineral.

+ = *in vitro* antagonism (inhibition halo ≥ 5 mm). / += antagonismo *in vitro* (halo de inhibición ≥ 5 mm).

Among the antagonistic bacteria, the strains *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) stood out, which were antagonistic against the three evaluated species of *Fusarium*. These three strains originated from the Atzacmulco location (Table 3).

estas, 13 cepas bacterianas (59%) fueron aisladas de la localidad de Atzacmulco, y tres cepas (13%) en cada una de las localidades Calimaya, Mina y Toluca. Entre los antagonistas (n=22), 10 (45%) cepas fueron antagonistas a *F. verticillioides*, 14 (63%) a *F. subglutinans* y 17 (81%) a *F. graminearum*. Entre las bacterias antagonistas destacaron las cepas

### Molecular identification of antagonists

The identification of the 22 antagonist strains was made possible through partial amplification of the 16S rRNA gene, which showed a similarity range of 99.02% to 99.49% when aligned against the NCBI gene bank (refer to Table 3). These strains belonged to various genera, including *Pseudomonas* (36.3%), *Bacillus* (31.8%), *Delftia* (9.09%), *Stenotrophomonas* (9.09%), *Micromonospora* (4.5%), *Sphingobacterium* (4.5%), and *Staphylococcus* (4.5%). Notably, *P. putida* (37.5%), *P. fluorescens* (25%), *P. geniculata*, and *P. syringae* (12.5%) were identified among the *Pseudomonas* species, while *B. amyloliquefaciens* (57.1%) and *B. subtilis* (28.5%) were the most common among the *Bacillus* species. It is worth mentioning that the majority of the antagonists (n=13) were isolated from Atlacomulco (59%), while the remaining strains (n=3) (14.3%) were obtained in equal proportions from Calimaya, Mina, and Toluca, respectively (refer to Table 2). Taxonomically, these 22 strains were distributed across four phyla and six orders, with the Firmicutes (Gram-positive) and Proteobacteria (Gram-negative) phyla, as well as the Bacillales and Pseudomonadales orders, having a higher abundance of *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Conversely, the *Micromonospora*, *Sphingobacterium*, and *Staphylococcus* genera were less abundant, with the Firmicutes (Gram-positive) and Bacteroidetes (Gram-negative) phyla, as well as the Actinomycetales, Sphingobacteriales, and Bacillales orders, having the least number of strains (refer to Table 4).

### Qualitative *in vitro* production of metabolites

The 22 antagonists showed *in vitro* lipolytic and proteolytic activity, produced siderophores, and solubilized mineral phosphate; however, only

*Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) las cuales fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* evaluados. Estas tres cepas tuvieron origen en la Localidad de Atlacomulco (Cuadro 3).

### Identificación molecular de antagonistas

La amplificación parcial del gen 16S rRNA permitió la identificación de las 22 cepas antagonistas entre 99.02 y 99.49% de similitud de acuerdo al alineamiento en el banco de genes del NCBI (Cuadro 3). Las cepas antagonistas pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* (36.3%), *Bacillus* (31.8%), *Delftia* (9.09%), *Stenotrophomonas* (9.09%), *Micromonospora* (4.5%), *Sphingobacterium* (4.5%) y *Staphylococcus* (4.5%). Entre las especies de *Pseudomonas*, se identificaron a *P. putida* (37.5%), *P. fluorescens* (25%), *P. geniculata* y *P. syringae* (12.5%); entre las especies de *Bacillus* a *B. amyloliquefaciens* (57.1%) y *B. subtilis* (28.5%). El mayor número de antagonistas (n=13) se aisló de la localidad de Atlacomulco (59%) y el resto en igual proporción (n= 3) (14.3%) de las localidades de Calimaya, Mina y Toluca respectivamente (Cuadro 2). Las 22 cepas antagonistas se distribuyeron taxonómicamente en cuatro Phyla y seis órdenes. Se registró mayor abundancia de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* en los Phyla Firmicutes (Gram positivas) y Proteobacteria (Gram negativas) y en los órdenes Bacillales y Pseudomonadales respectivamente. La menor abundancia en los géneros *Micromonospora*, *Sphingobacterium* y *Staphylococcus*, en los Phyla Firmicutes (Gram positivas) Bacteroidetes (Gram negativas), en los órdenes Actinomycetales, Sphingobacteriales y Bacillales respectivamente (Cuadro 4).

### Producción cualitativa *in vitro* de metabolitos

Los 22 antagonistas mostraron *in vitro* actividad lipolítica, proteolítica, produjeron sideróforos

**Table 4. Taxonomic distribution of 22 bacterial strains antagonistic *in vitro* against *Fusarium* spp. isolated from sclerotia of *C. gigantea*.**

**Cuadro 4. Distribución taxonómica de 22 cepas bacterianas antagonistas *in vitro* contra *Fusarium* spp. aisladas de esclerocios de *C. gigantea*.**

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Frecuencia %
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	36.3
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	31.8
Proteobacteria	Beta Proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Delftia</i>	9.1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	9.1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	4.5
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	4.5
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	4.5

12 (55%) produced indole-3-acetic acid. Only the strains *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) were antagonistic against the three species of *Fusarium* and produced all the evaluated metabolites (Figure 2, Table 3).

y solubilizaron fosfato mineral; sin embargo, solamente 12 (55%) produjeron ácido indol-3-acético. Únicamente las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron todos los metabolitos evaluados (Figura 2, Cuadro 3).

## DISCUSSION

In this study, we estimated bacterial density in *C. gigantea* sclerotia and evaluated their *in vitro* antagonism against three *Fusarium* species causing ear rot in maize. Our results showed varying bacterial densities associated with *C. gigantea* sclerotia across the different sampled locations. The highest bacterial density was recorded in the lots of Atlacomulco (2.397), while the lowest was observed in Villa Victoria (2.023) Log<sub>10</sub>CFU g<sup>-1</sup> of sclerotium. This variation may be attributed to the use of agrochemical products and/or residues as part of the agronomic management of the crop, which may have affected the diversity and density of microorganisms associated with maize cultivation (FAO, 2010). Thus, there is a need for further research to examine the impact of agrochemical residues used in the sampled sites on

## DISCUSIÓN

En esta investigación se estimó la densidad bacteriana en esclerocios de *C. gigantea* y se evaluó su antagonismo *in vitro* contra tres especies de *Fusarium* causantes de pudrición de mazorca en maíz. Los resultados mostraron diferente densidad bacteriana asociada a esclerocios de *C. gigantea* en las diferentes localidades muestreadas; la mayor densidad bacteriana se registró en los lotes de Atlacomulco (2.397) y la menor en Villa Victoria (2.023) Log<sub>10</sub>UFC g<sup>-1</sup> de esclerocio respectivamente. Lo anterior puede deberse a la utilización de productos y/o residuos agroquímicos utilizados como parte del manejo agronómico del cultivo que pudieron afectar la diversidad y densidad de microorganismos asociados al cultivo del maíz (FAO, 2010), lo cual sugiere la necesidad de conducir estudios sobre



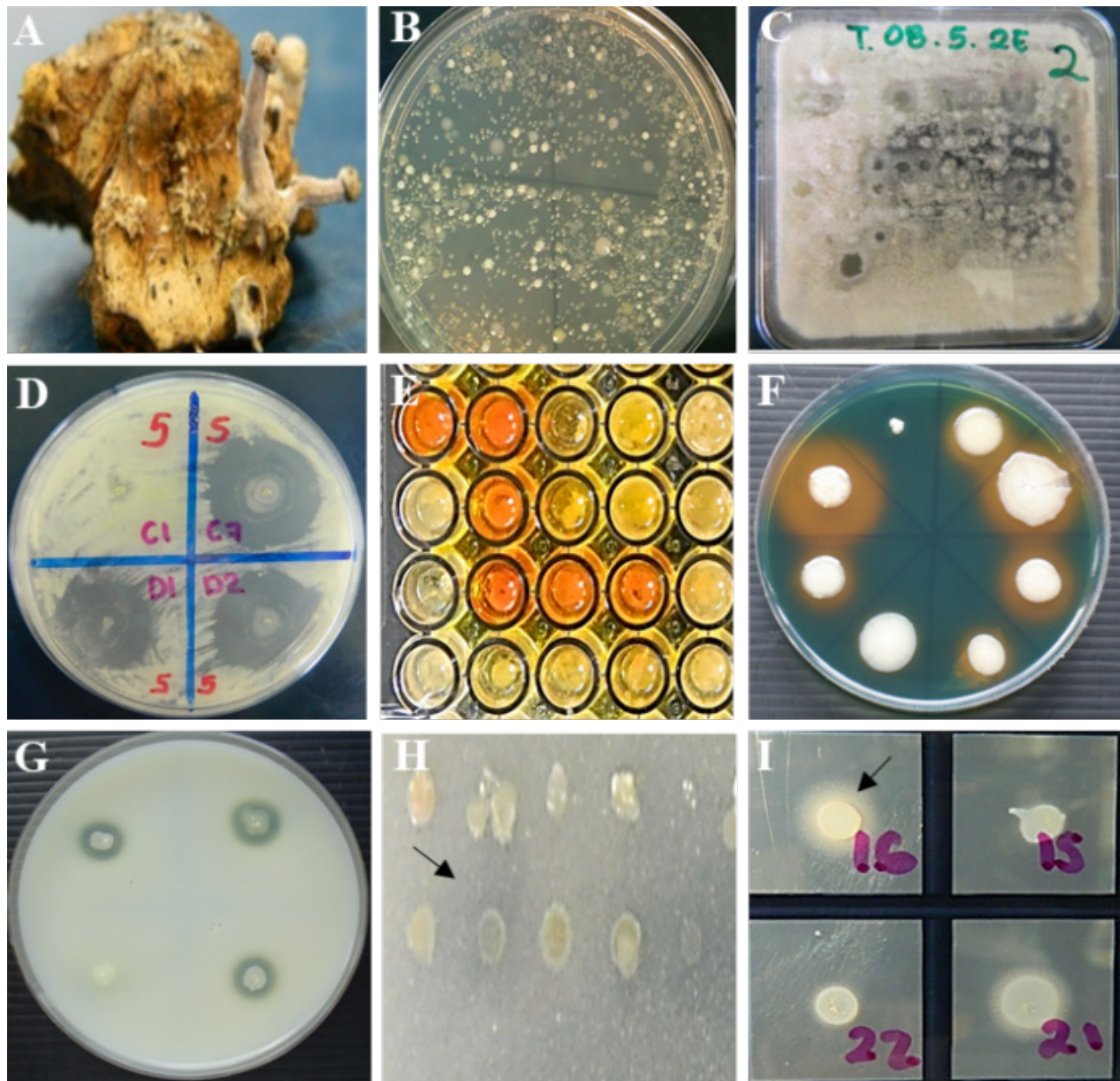


Figure 2. *In vitro* antagonism. A) Sclerotia of *C. gigantea*, B) bacterial growth from 1 g of sclerotia on R2A medium, C) *in vitro* antagonism of bacteria in Waksman agar culture medium inoculated with a multipoint inoculator (Boekel®, 96-point microplate replicator 96 points) against *Fusarium* spp. D) selection of antagonistic bacterial strains showing inhibition zones  $\geq 5$  mm of fungal growth of *Fusarium* spp. *In vitro* production of metabolites by antagonistic strains. E) production of indole-3-acetic acid, F) production of siderophores, G) proteolytic activity, H) mineral phosphate solubilization, I) lipolytic activity. Strains that showed reddish coloration of the medium, yellow, clear and opaque halo around the colony, respectively, were considered positive.

Figura 2. Antagonismo *in vitro*. A) esclerocio de *C. gigantea*, B) crecimiento bacteriano a partir de 1 g de esclerocio en medio R2A, C) antagonismo *in vitro* de bacterias en medio de cultivo Waksman agar inoculadas con un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator 96 puntos) contra *Fusarium* spp. D) selección de cepas bacterianas antagonistas evidenciando halos de inhibición  $\geq 5$  mm del crecimiento fúngico de *Fusarium* spp. Producción *in vitro* de metabolitos por antagonistas. E) producción de ácido indol-3-acético, F) producción de sideróforos, G) actividad proteolítica, H) solubilización de fósforo mineral, I) actividad lipolítica. Se consideraron positivas las cepas que evidenciaron coloración rojiza del medio, halo amarillo, claro y opaco alrededor de la colonia respectivamente.

the structure and diversity of bacterial communities in sclerotia. Additionally, it has also been shown that bacterial density is closely related to the sources of carbon contained in sclerotia exudates (Coley-Smith and Dickenson, 1971). Hence, future research should focus on identifying the sources of carbon present in *C. gigantea* sclerotia exudates and their quantity. Previous studies have shown that bacterial populations are associated with sclerotia. Coley-Smith and Dickenson (1971) found that the *Sclerotium cepivorum* fungus sclerotia favor the growth of specific bacteria due to the exudates containing carbon sources such as ethanol, trehalose, glucose, and mannitol, and that this microenvironment constitutes a specific ecological niche. Similarly, Gilbert and Linderman (1971) reported qualitative changes and increased microbial activity in soil near *Sclerotium rolfisii* sclerotia attributed to the exudates in the sclerotia of this pathogen. These authors coined the term “mycosphere” to describe the portion of soil influenced by sclerotia, which harbors bacterial populations with a greater representation of antagonistic species against *S. rolfisii* than those obtained from other ecological niches.

In this study, 129 bacterial strains were isolated from sclerotia in various sampled locations. Of these, 22 (17%) showed *in vitro* antagonism against one or more *Fusarium* species that cause maize ear rot, indicated by a fungal growth inhibition halo of  $\geq 5$  mm. Through partial sequencing of the 16S rRNA gene, it was possible to identify the 22 antagonistic bacterial strains as belonging to the genera *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus*, and *Stenotrophomonas*.

The most abundant antagonists in *C. gigantea* sclerotia belonged to the genera *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) (36.3%) and *Bacillus* (Bacillaceae) (31.8%). In both genera, their mechanisms for phytopathogen biocontrol

los residuos de agroquímicos utilizados en los sitios muestreados y su efecto en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en los esclerocios. Así mismo, se ha demostrado que la densidad bacteriana está estrechamente relacionada con las fuentes de carbono contenidas en los exudados de esclerocios (Coley-Smith y Dickenson, 1971) por lo que investigaciones futuras deberán enfocarse en determinar las fuentes de carbono presentes en los exudados de los esclerocios de *C. gigantea* y en qué cantidad se encuentran. La presencia de bacterias asociadas a esclerocios se ha evidenciado en otras investigaciones. Coley-Smith y Dickenson (1971) evidenciaron que los esclerocios del hongo *Sclerotium cepivorum*, favorecen el crecimiento de bacterias específicas debido a los exudados que contienen fuentes de carbono como etanol, trehalosa, glucosa y manitol y que este microambiente constituye un nicho ecológico específico. Gilbert y Linderman (1971) reportaron cambios cualitativos e incremento de la actividad microbiana en el suelo cercano a los esclerocios de *Sclerotium rolfisii* atribuido a los exudados en los esclerocios de este patógeno. Estos autores denominaron “micosfera” a la porción de suelo influenciado por los esclerocios y demostraron que albergan poblaciones bacterianas con mayor representatividad de especies antagonicas contra *S. rolfisii* que las obtenidas de otros nichos ecológicos.

En esta investigación, de 129 cepas bacterianas aisladas de esclerocios de las diferentes localidades muestreadas, 22 (17%) de ellas se identificaron por su antagonismo *in vitro* (halo de inhibición del crecimiento fúngico  $\geq 5$  mm) contra una o más especies de *Fusarium* que causan pudrición de mazorca de maíz. Mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, fue posible identificar a las 22 cepas bacterianas antagonistas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*

mediated by antibiosis, competition for nutrients and space, promotion of growth, and induction of resistance in plants have been elucidated (Cui *et al.*, 2019; Dimkić *et al.*, 2022; Fira *et al.*, 2018; Guzmán-Guzmán and Santoyo, 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022).

The findings of this investigation align with those of previous studies, which have highlighted the prevalence of both *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) (36.3%) and *Bacillus* (Bacillaceae) (31.8%) genera colonizing *Rhizoctonia solani* sclerotia (Zachow *et al.*, 2011) and *Sclerotium cepivorum* (Backhouse and Stewart, 1989; Utkhede and Rahe, 1980), demonstrating their strong antagonism against these pathogens. *Stenotrophomonas* genus was also identified in this research. Wong and Hughes (1986) have shown that *Bacillus* species constitute 80% of antagonists isolated from soil and *S. cepivorum* sclerotia samples. This genus includes a group of Gram-positive bacteria with high phenotypic and genetic heterogeneity, considered among the most common colonizers in various ecological niches (Abriouel *et al.*, 2011). Although most of the identified strains in this study were *in vitro* antagonistic against one or two *Fusarium* species, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18), *B. subtilis* (BA1), and *Pseudomonas syringae* (BA2) strains were antagonistic against all three evaluated *Fusarium* species (*F. graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides*) causing maize ear rot.

In other studies, *B. amyloliquefaciens* has been reported as an antagonist with high potential for the biocontrol of other *Fusarium* species in spinach (*Spinacia oleracea*) (Zhao *et al.*, 2014), banana (*Musa* sp.) (Tian *et al.*, 2021), tomato (*Solanum lycopersicum*) (Elanchezhian *et al.*, 2018; Proca *et al.*, 2020), and wheat (*Triticum* sp.) (Ursan *et al.*, 2019). Some strains of *B. amyloliquefaciens* have been reported as antagonists and efficient

Los antagonistas más abundantes en esclerocios de *C. gigantea* pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) (36.3%) y *Bacillus* (Bacillaceae) (31.8%). En ambos géneros se han dilucidado sus mecanismos para el biocontrol de fitopatógenos mediado por antibiosis, competencia por nutrientes y espacios, promoción del crecimiento e inducción de resistencia en plantas (Cui *et al.*, 2019; Dimkić *et al.*, 2022; Fira *et al.*, 2018; Guzmán-Guzmán y Santoyo, 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022).

Los resultados de esta investigación coinciden con los obtenidos en otras investigaciones en donde destacan la mayor abundancia de ambos géneros colonizando esclerocios de *Rhizoctonia solani* (Zachow *et al.*, 2011) y *Sclerotium cepivorum* (Backhouse y Stewart, 1989; Utkhede y Rahe, 1980) evidenciando fuerte antagonismo contra estos patógenos, además del género *Stenotrophomonas* el cual también se identificó en esta investigación. Wong y Hughes (1986) demostraron que el 80% de los antagonistas aislados de muestras de suelo y esclerocios de *S. cepivorum* fueron especies del género *Bacillus*. Este género incluye un grupo de bacterias Gram positivas con alta heterogeneidad fenotípica y genética considerados entre los colonizadores más comunes en diversos nichos ecológicos (Abriouel *et al.*, 2011). En este estudio, la mayoría de las cepas identificadas fueron antagonistas *in vitro* contra una o dos especies de *Fusarium*; sin embargo, las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18), *B. subtilis* (BA1) y *Pseudomonas syringae* (BA2) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* evaluados (*F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*) causantes de pudrición de mazorca de maíz.

En otras investigaciones, *B. amyloliquefaciens* se ha reportado como antagonista con alto potencial para el biocontrol de otras especies de *Fusarium* en espinaca (*Spinacia oleracea*) (Zhao *et al.*,

biocontrol agents against *F. graminearum* (de Ángel *et al.*, 2021; Gu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019) and *F. verticillioides* (Xu *et al.*, 2021).

The prevalence and antagonism of *B. subtilis* isolated from sclerotia of *C. gigantea* coincides with other studies. Utkhede and Rahe (1980) showed that there is a greater prevalence of *B. subtilis* in *S. cepivorum* sclerotia collected from various parts of the world and that most of these strains significantly protected onion (*Allium cepa*) from white rot caused by this pathogen when inoculated into seed at the time of planting. These authors attributed the prevalence of *B. subtilis* to specific carbohydrates contained in the exudates of *S. cepivorum* sclerotia. Also, strains of *B. subtilis* have shown antagonism and efficient biocontrol against *F. graminearum* and *F. verticillioides* in wheat and maize, respectively (Cavaglieri *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021).

The genus *Pseudomonas* includes Gram-negative species which have been widely studied as an alternative in the biological control of phytopathogens and promotion of plant growth (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán and Santoyo, 2022; Singh *et al.*, 2022). *Pseudomonas syringae*, identified in this study as an antagonist against the three species of *Fusarium*, belongs to the *P. fluorescens* species complex and has been described as an important biocontrol agent along with *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, and *P. putida* (Panpatte *et al.*, 2016). *Pseudomonas syringae* is a species complex that includes phytopathogenic strains on a wide range of host plants (Baltrus *et al.*, 2017). However, non-phytopathogenic strains of *P. syringae* have been identified whose genome harbors an extensive group of genes related to the biocontrol of phytopathogens, promotion of growth, and induction of resistance in plants

(2014), banano (*Musa* sp.) (Tian *et al.*, 2021), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Elanchezhian *et al.*, 2018; Proca *et al.*, 2020) y trigo (*Triticum* sp.) (Ursan *et al.*, 2019). Algunas cepas de *B. amyloliquefaciens* se han reportado como antagonistas y eficientes agentes de biocontrol de *F. graminearum* (de Ángel *et al.*, 2021; Gu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019) y *F. verticillioides* (Xu *et al.*, 2021).

La prevalencia y antagonismo de *B. subtilis* aislado de esclerocios de *C. gigantea*, coincide con otros estudios. Utkhede y Rahe (1980) demostraron que existe mayor prevalencia de *B. subtilis* en esclerocios de *S. cepivorum* colectados de varias partes del mundo y que la mayoría de estas cepas protegieron significativamente a la cebolla (*Allium cepa*) de la pudrición blanca causado por este patógeno cuando se inocularon en semilla al momento de la siembra. Estos autores atribuyeron la prevalencia de *B. subtilis* a los carbohidratos específicos contenidos en los exudados de los esclerocios de *S. cepivorum*. También, cepas de *B. subtilis* han mostrado antagonismo y eficiente biocontrol contra *F. graminearum* y *F. verticillioides* en trigo y maíz respectivamente (Cavaglieri *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021).

El género *Pseudomonas* incluye especies Gram negativas las cuales han sido ampliamente estudiadas como una opción en el control biológico de fitopatógenos y promoción del crecimiento de plantas (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán y Santoyo 2022; Singh *et al.*, 2022). *Pseudomonas syringae* identificada en este estudio como antagonista contra las tres especies de *Fusarium* pertenece al complejo de especies de *P. fluorescens* y se ha descrito como una especie importante como agente de biocontrol junto con *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* y *P. putida* y (Panpatte *et al.*, 2016). *Pseudomonas syringae* es un complejo de especies que incluye cepas fitopatógenas en

(Passera *et al.*, 2019). Yu *et al.* (2017) showed that the *Pseudomonas syringae* BAF.1 strain completely inhibited the germination of conidia and affected the structure of the mycelium of *Fusarium oxysporum*, proposing it as a promising biocontrol agent against this pathogen.

In this research, *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) strains were antagonistic against all three *Fusarium* species and produced *in vitro* all evaluated metabolites (indole-3-acetic acid production, lipolytic and proteolytic enzymes, siderophores, and mineral phosphate solubilization) (Table 3). The production of these metabolites has been shown to play an important role in the biocontrol of phytopathogenic fungi and promotion of plant growth (Sagar *et al.*, 2022). Proteolytic and lipolytic enzymes produced by *Bacillus* and *Pseudomonas* species cause cellular lysis of fungi; siderophores are antimicrobial compounds that facilitate iron mobilization and solubilization of nutrients not available to plants (Admassie *et al.*, 2022). The production of plant growth regulators such as indole-3-acetic acid stimulates the development of the plant root system and induces resistance to pathogens; while mineral solubilization such as phosphorus promotes plant development, induces resistance to pathogens, and improves water and nutrient uptake (Mahapatra *et al.*, 2022; Sagar *et al.*, 2022).

The ability of *Bacillus* and *Pseudomonas* species to produce a wide range of secondary metabolites encoded by various gene clusters has been suggested to result in disease suppression, growth promotion, and induction of resistance in plants (Andrić *et al.*, 2020; Dimkić *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022). However, it is important to note that the proportion of genes involved in the synthesis of antimicrobial compounds and other bioactive secondary metabolites varies depending on the

un amplio rango de plantas hospedantes (Baltrus *et al.*, 2017); sin embargo, se han identificado cepas de *P. syringae* no fitopatógenas cuyo genoma alberga un extenso grupo de genes relacionados con el biocontrol de fitopatógenos, promoción de crecimiento e inducción de resistencia en plantas (Passera *et al.*, 2019). Yu *et al.* (2017), demostraron que la cepa *Pseudomonas syringae* BAF.1 inhibió completamente la germinación de conidios y afectó la estructura del micelio de *Fusarium oxysporum* proponiéndolo como un promisorio agente de biocontrol contra este patógeno.

En esta investigación, las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron *in vitro* todos los metabolitos evaluados (producción de ácido indol-3-acético; enzimas lipolíticas y proteolíticas, sideróforos y solubilización de fosfato mineral) (Cuadro 3). Se ha evidenciado que la producción de estos metabolitos juega un papel importante en el biocontrol de hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento de plantas (Sagar *et al.*, 2022). Las enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas por especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* causan lisis celular de hongos; los sideróforos son compuestos antimicrobianos que facilitan la movilización de hierro y solubilización de nutrientes no disponibles por las plantas (Admassie *et al.*, 2022). La producción de reguladores del crecimiento vegetal como el ácido indol-3-acético estimula el desarrollo del sistema radical de las plantas e inducen resistencia a patógenos; en tanto que la solubilización de minerales como el fósforo promueve el desarrollo de las plantas, inducen resistencia a patógenos y mejoran la absorción de agua y otros nutrientes (Mahapatra *et al.*, 2022; Sagar *et al.*, 2022).

Se ha sugerido que en especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, la supresión de enfermedades, promoción de crecimiento e inducción de resistencia

species and strain (Devi *et al.*, 2019). Therefore, prior to registering their 16S rRNA sequences in the NCBI GenBank, it is recommended to further investigate the genome characteristics of the three antagonistic strains identified in this research. Previous studies have shown that inoculation of *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. strains promotes growth and induces resistance in maize plants (Egamberdiyeva *et al.*, 2007).

Species of the genus *Bacillus* are promising biological control agents due to their genetic characteristics, high heat and desiccation resistance through the formation of endospores (Luo *et al.*, 2022). These strains are considered to be safe for human health, hence there are no restrictions on their use as biocontrol agents according to the United States Environmental Protection Agency (Dimkić *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2006). Additionally, commercial formulations of *P. syringae* are approved for the management of *Fusarium* spp. in post-harvest in the USA and Canada (Al-Mughrabi *et al.*, 2013). Therefore, the *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *B. amyloliquefaciens* (BA18) strains identified in this research, isolated from sclerotia of *C. gigantea* that were antagonistic *in vitro* against three *Fusarium* species causing corn ear rot, and multifunctional in the production of secondary metabolites, represent an important biotechnological resource for future investigations as biocontrol agents against this pathogen in corn cultivation in Mexico.

## CONCLUSIONS

The findings of this study suggest that the sclerotia of *C. gigantea* contain varying densities of bacterial populations, with those from the Atlacomulco locality exhibiting the highest density. Among these bacterial populations are strains that

en plantas son resultado de su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios codificados por diversos grupos de genes (Andrić *et al.*, 2020; Dimkić *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022); sin embargo, se consigna que la proporción de estos genes en el genoma involucrada en la síntesis de compuestos antimicrobianos y otros metabolitos secundarios bioactivos dependen de la especie y la cepa (Devi *et al.*, 2019), por lo que se sugiere profundizar en el conocimiento sobre las características del genoma de estas tres cepas antagonistas identificadas en esta investigación, previo al registro de las secuencias 16S rRNA en el GenBank del NCBI. Se ha demostrado que la inoculación de cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. promueven el crecimiento e inducen la resistencia en plantas de maíz (Egamberdiyeva *et al.*, 2007).

Especies del género *Bacillus* son promisorios agentes de control biológico debido a sus características genéticas, alta resistencia al calor y desecación por la formación de endosporas (Luo *et al.*, 2022); se consideran cepas que no representan un riesgo a la salud humana por lo cual no hay restricciones para su uso como agentes de biocontrol de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de EUA (Dimkić *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2006). Así mismo, formulaciones comerciales de *P. syringae* están aprobadas para el manejo de *Fusarium* spp. en postcosecha en EUA y Canadá (Al-Mughrabi *et al.*, 2013). Por lo anterior, las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *B. amyloliquefaciens* (BA18) identificadas en esta investigación, aisladas de esclerocios de *C. gigantea* antagonistas *in vitro* contra tres especies de *Fusarium* causantes de pudrición en mazorca de maíz, multifuncionales en la producción de metabolitos secundarios, son un recurso biotecnológico importante para futuras investigaciones como agentes de biocontrol contra este patógeno en el cultivo de maíz en México.

exhibit antagonism against at least one species of *Fusarium*, known to cause corn ear rot and produce metabolites that may promote plant growth. Through sequencing of the 16S rRNA gene, *Bacillus* and *Pseudomonas* genera were identified as the most abundant antagonistic bacteria in *C. gigantea* sclerotia. *In vitro* experiments demonstrated that *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) strains were effective antagonists against all three species of *Fusarium* evaluated, with *Fusarium graminearum* being the most susceptible. These results suggest that these strains may represent a viable option for biocontrol of *Fusarium* species in maize cultivation in Mexico.

#### ACKNOWLEDGMENTS

To the National Council for Science and Technology (CONACyT). To Dr. Dolores Briones Reyes from the Postgraduate Program in Genetic Resources and Productivity at the College of Postgraduates Montecillo campus for donating the *Fusarium* spp. strains used in this research.

#### CITED LITERATURE

- Abdullah MT, Ali NY and Suleman P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 27: 1354-1359. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.05.007>
- Admassie M, Woldehawariat Y and Alemu T. 2022. *In vitro* evaluation of extracellular enzyme activity and its biocontrol efficacy of bacterial isolates from pepper plants for the management of *Phytophthora capsici*. *BioMed Research International* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6778352>
- Aguirell SL, Ramstad E and Ullstrup AJ. 1963. The alkaloids of maize ergot. Part V of biogenetic studies in ergot; Part IV: *Svensk Farmaceutisk Tidskrift* 66(741). *Planta Medica* 11:392-398. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1100254>
- Al-Mughrabi KI, Vikram A, Peters RD, Howard RJ, Grant L, Barasubiye T and Jayasuriya KE. 2013. Efficacy of *Pseudomonas syringae* in the management of potato tuber diseases in storage. *Biological Control* 64:315-322. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.011>

#### CONCLUSIONES

Los esclerocios de *C. gigantea* albergan diferente densidad de poblaciones bacterianas. En los esclerocios con origen en la localidad de Atlacomulco Estado de México hay mayor densidad bacteriana que en el resto de las localidades. Entre las poblaciones bacterianas que colonizan los esclerocios existen cepas antagonistas contra al menos una especie de *Fusarium* que causan pudrición de mazorca en maíz y producen diversos metabolitos posiblemente implicados con el antagonismo y promoción del crecimiento de plantas. De 22 cepas bacterianas antagonistas, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA identificó a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* como las bacterias antagonistas más abundantes en esclerocios de *C. gigantea*. *Fusarium verticillioides* es menos sensible que *F. subglutinans* y *F. graminearum* al antagonismo *in vitro* de las cepas bacterianas aisladas de esclerocios de *C. gigantea*; *Fusarium graminearum* es la más sensible entre las tres especies de *Fusarium* evaluadas. Las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) son antagonistas *in vitro* eficientes contra las tres especies de *Fusarium* y una potencial alternativa para el biocontrol de estos patógenos en el cultivo de maíz en México.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). A la Dra. Dolores Briones Reyes del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados campus Montecillo por la donación de las cepas de *Fusarium* spp. utilizadas en esta investigación.

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

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Andrić S, Meyer T and Ongena M. 2020. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology* 11:1350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>
- Backhouse D and Stewart A. 1989. Interactions between *Bacillus* species and sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Soil Biology and Biochemistry* 21:173-176. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90029-1)
- Baker GC, Smith JJ and Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55:541-555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Baltrus DA, McCann HC and Guttman DS. 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 18:152-168. <https://doi.org/10.1111/mpp.12506>
- Bragg PE, Maust MD and Panaccione DG. 2017. Ergot alkaloid biosynthesis in the maize (*Zea mays*) ergot fungus *Claviceps gigantea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(49): 10703–10710. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04272>
- Cavaglieri L, Orlando JR, Rodriguez MI, Chulze S and Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156:748-754. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: Una Guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F. CIMMYT. 112 p.
- CIMMYT. 2019. Maíz para México. Plan Estratégico 2030. <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/20219>
- Cochran WG. 1982. Técnicas de muestreo. Compañía Editorial Continental. México. 513 p.
- Coley-Smith JR and Dickinson DJ. 1971. Effects of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. on soil bacteria. The nature of substances exuded by sclerotia. *Soil Biology and Biochemistry* 3(1):27-32. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(71\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(71)90028-9)
- Cui W, He P, Munir S, He P, Li X, Li Y, Wu J, Yang L, He P and He Y. 2019. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biological Control* 139:104080. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104080>
- de Ángel EC, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, and Ochoa-Fuentes YM. 2021. Actividad antifúngica de bacterias endófitas para el control de *Fusarium verticillioides* en maíz. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(2): e2790. <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2790>
- Devi S, Kiesewalter HT, Kovács R, Frisvad JC, Weber T, Larsen TO, Kovács AT and Ding L. 2019. Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology* 4(3):142-149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.08.002>
- Dimkić I, Janakiev T, Petrović M, Degrassi G and Fira D. 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 117:101754. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>
- Egamberdiyeva D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36:184–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.02.005>
- Elanchezhian K, Keerthana U, Nagendran K, Prabhukarthikeyan SR, Prabakar K, Raguchander T and Karthikeyan G. 2018. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 103:92-101. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.008>
- El-Yazeid AA, Abou-Aly HA, Mady MA and Moussa SAM. 2007. Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (bio phosphor) combined with boron foliar spray. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3:274-286.
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J and Stanković S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285:44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fucikovsky L and Moreno M. 1976. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the state of México, México. *Plant Disease Reporter* 55:231-233.
- Fuentes SF, De la Isa ML, Ullstrup AJ and Rodríguez AE. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of Maize in Mexico. *Phytopathology* 54(4):379-381.
- García-López V and Giraldo OF. 2021. Redes y estrategias para la defensa del maíz en México. *Revista Mexicana de Sociología* 83(2):297-329.
- Guzmán-Guzmán P and Santoyo G. 2022. Action mechanisms, biodiversity, and omics approaches in biocontrol and plant growth-promoting *Pseudomonas*: an updated review. *Biocontrol Science and Technology* 32(5):527–550. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2066630>
- Gilbert RG and Linderman RG. 1971. Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 17(4):557-562. <https://doi.org/10.1139/m71-091>
- Gu Q, Yang Y, Yuan Q, Shi G, Wu L, Lou Z, Huo R, Wu H, Borriss R and Gao X. 2017. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plantpathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied Environmental Microbiology* 83:e01075-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01075-17>



- Guimarães RA, Zanotto E, Perrony PEP, Zanotto LAS, da Silva LJ, Machado JDC and de Medeiros FHV. 2021. Integrating a chemical fungicide and *Bacillus subtilis* BIOUFLA2 ensures leaf protection and reduces ear rot (*Fusarium verticillioides*) and fumonisin content in maize. *Journal of Phytopathology* 169(3):139-148. <https://doi.org/10.1111/jph.12968>
- Hantsis-Zacharov E and Halpern M. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22):7162-7168. <https://doi.org/10.1128/aem.00866-07>
- Hof H. 2020. The medical relevance of *Fusarium* spp. *Journal of Fungi* 6(3): 117. <https://doi.org/10.3390/jof6030117>
- Hou X, Boyetchko SM, Brkic M, Olson D, Ross A and Hegedus D. 2006. Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(4):644-653. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0315-8>
- Liu Y, Lu J, Sun J, Lu F, Bie X and Lu Z. 2019. Membrane disruption and DNA binding of *Fusarium graminearum* cell induced by C16-Fengycin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Food Control* 102:206-213. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.031>
- Luo L, Zhao C, Wang E, Raza A and Yin C. 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research* 259:127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Mahapatra S, Yadav R and Ramakrishna W. 2022. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology* 132(5): 3543-3562. <https://doi.org/10.1111/jam.15480>
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez J, Buckler E and Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(9):6080-6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Mesterhazy A, Lemmens M and Reid LM. 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. *Plant Breeding* 131(1):1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01936.x>
- Mielniczuk E and Skwaryło-Bednarz B. 2020. *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy* 10(4):509. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>
- Moreno-Limón S, González-Solís LN, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Ávila ML and Perales-Ramírez A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.12>
- Padrón HYM, Delgado SH, Méndez CAR and Carrillo GV. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 126-146.
- Panpatte DG, Jhala YK, Shelat HN and Vyas RV. 2016. *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. In: Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (pp. 257-270). Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_15)
- Passera A, Compant S, Casati P, Maturo MG, Battelli G, Quaglino F, Antonielli L, Salerno D, Brasca M, Toffolatti SL, Mantegazza F, Delledonne M and Mitter B. 2019. Not Just a Pathogen? Description of a Plant-Beneficial *Pseudomonas syringae* Strain. *Frontiers in Microbiology* 10:1409. doi: 10.3389/fmicb.2019.01409
- Peng S, Zhou Q, Cai Z and Zhang Z. 2009. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials* 168(2-3):1490-1496. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.036>
- Proca IG, Diguță CF, Cornea CP, Jurcoane S and Matei F. 2020. Halotolerant *Bacillus amyloliquefaciens* 24.5. *Rom Biotechnology Letters* 25(4):1744-1753.
- Sagar A, Yadav SS, Sayyed RZ, Sharma S and Ramteke PW. 2022. *Bacillus subtilis*: a multifarious plant growth promoter, biocontrol agent, and bioalleviator of abiotic stress. In *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting* (pp. 561-580). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2_24)
- Schwyn B, and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160(1):47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Singh P, Singh RK, Zhou Y, Wanga J, Jiangb Y, Shena N, Wanga Y, Yangb L and Mingguo J. 2022. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review. *Journal of Plant Interactions* 17(1):220–238. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Solano-Báez AR, Cuca-García JM, Delgado-Alvarado A, Panaccione D, De León-García de Alba C, Leyva-Mir SG, Sánchez-Pale JR and Hernández-Morales J. 2018. Biological activity of *Claviceps gigantea* in juvenile New Zealand rabbits. *Mycotoxin Research* 34:297-305. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0324-3>
- Tian D, Song X, Li C, Zhou W, Qin L, Wei L, Di W, Huang S, Li B, Huang Q, Long S, Hew Z and Wei S. 2021. Antifungal mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GKT04 against *Fusarium* wilt revealed using genomic and transcriptomic analyses. *Microbiology Open* 10(3):e1192. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1192>

- Ullstrup AJ. 1973. Maize ergot: a disease with a restricted ecological niche. PANS Pest Articles & News Summaries 19(3):389-391. <https://doi.org/10.1080/09670877309412786>
- Ursan MD, Boiu-Sicuia OA and Cornea CP. 2019. *Bacillus amyloliquefaciens* strains with biocontrol potential against *Fusarium* spp. wheat pathogens. Scientific Papers. Series A. Agronomy: 486-491. <https://doi.org/10.2478/alife-2018-0093>
- Utkhede RS and Rahe JE. 1980. Biological control of onion white rot. Soil Biology and Biochemistry 12(2):101-104. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(80\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(80)90043-7)
- Wang S, Sun L, Zhang W, Chi F, Hao X, Bian J and Li Y. 2020. *Bacillus velezensis* BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. Egyptian Journal of Biological Pest Control 30(1):1-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0209-6>
- Wong WC and Hughes IK. 1986. *Sclerotium cepivorum* Berk. in onion (*Allium cepa* L.) crops: isolation and characterization of bacteria antagonistic to the fungus in Queensland. Journal of Applied Bacteriology 60(1):57-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01065.x>
- Xu S, Wang Y, Hu J, Chen X, Qiu Y., Shi J, Wang G and Xu J. 2021. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01, a bifunctional biocontrol bacterium with antagonistic activity against *Fusarium graminearum* and biodegradation capacity of zearalenone. Food Control 130:108259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108259>
- Yu C, Liu X, Zhang X, Zhang M, Gu Y, Ali Q, Mohamed MSR, Xu J, Shi J, Gao X, Wu H and Gu Q. 2021. Mycosubtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 inhibits growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. Toxins 13(11):791. <https://doi.org/10.3390/toxins13110791>
- Yu S, Teng C, Liang J, Song T, Dong L, Bai, X Jin Y and Qu J. 2017. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. Journal Microbiology 55:877-884. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7191-z>
- Zachow C, Grosch R and Berg G. 2011. Impact of biotic and a-biotic parameters on structure and function of microbial communities living on sclerotia of the soil-borne pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Applied Soil Ecology 48(2):193-200. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.03.006>
- Zenteno-Zevada M, 1963. Estudios sobre hongos parásitos de gramíneas de la República Mexicana. III. Pruebas de inoculación en plántulas de maíz con *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. In Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 34: 69-83. <https://doi.org/10.21829/fb.289.2000.82>
- Zhao P, Quan C, Wang Y, Wang J and Fan S. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. Journal of Basic Microbiology 54(5):448-456. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200414>

# *Neopestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum karstii*, causal agents of leaf spots on camedor palm (*Chamaedorea quezalteca*) in Mexico

## *Neopestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum karstii* agentes causales de manchas foliares en palma camedor (*Chamaedorea quezalteca*) en México

Martibel Sarmiento-Chacón, Vidal Hernández-García, Luis Alfredo Rodríguez-Larramendi, Miguel Ángel Salas-Marina\*, Laboratorio de biofertilizantes y bioinsecticidas, Facultad de Ingeniería sede Villa Corzo, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Carretera Villa Corzo Ejido Monterrey Km 3.0. CP. 29000, Chiapas, México; Claudio Ríos-Velasco, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo-CIAD, C.P. 31570, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

\*Corresponding autor: miguel.salas@unicach.mx.

Received: February 13, 2022.

Accepted: April 05, 2023.

Sarmiento-Chacón M, Hernández-García V, Rodríguez-Larramendi LA, Salas-Marina M and Ríos-Velasco C. 2023. *Neopestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum karstii*, causal agents of leaf spots on camedor palm (*Chamaedorea quezalteca*) in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 165-181.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-7>

First DOI publication: April 21, 2023.

Primera publicación DOI: 21 de Abril, 2023.

**Abstract.** Since 2020, camedor palm (*Chamaedorea quezalteca*) plantations in the Frailesca region, Chiapas, Mexico, have been affected by foliar diseases that induce leaf spot and anthracnose symptoms that reduce production, leaf quality and thus the loss of their commercial value. The objectives of this work were to identify the causal agents and to quantify the incidence and

**Resumen.** Las plantaciones de palma camedor (*Chamaedorea quezalteca*) de la región Frailesca, Chiapas, México, desde el 2020 son afectadas por enfermedades foliares que inducen síntomas de mancha foliar y antracnosis que reducen la producción, calidad de las hojas y con ello la pérdida de su valor comercial. Los objetivos de este trabajo fueron identificar los agentes causales y cuantificar la incidencia y severidad de las enfermedades foliares en plantaciones de palma camedor. De manera recurrente se aislaron dos hongos, uno de hojas con síntomas de mancha foliar y otro de antracnosis, ambos fueron identificados morfológicamente y molecularmente mediante la secuenciación del espaciador de transcrito interno (ITS5/ITS4), las pruebas de patogenicidad se realizaron en plantas sanas donde se inocularon conidios de los hongos, y en campo se cuantificó la incidencia y severidad de la enfermedad con apoyo de una escala pictográfica. Los hongos identificados fueron

severity of foliar diseases in plantations of camedor palm. Two fungi were recurrently isolated, one from leaves with leaf spot symptoms and the other with anthracnose, both were identified morphologically and molecularly by sequencing the internal transcribed spacer (ITS5/ITS4), pathogenicity tests were performed on healthy plants where fungal conidia were inoculated, and in the field the incidence and severity of the disease were quantified with the support of a pictographic scale. The fungi identified were *Neopestalotiopsis* sp. in leaf spot symptoms and *Colletotricum karstii* in anthracnose, both pathogens reproduced the same symptoms observed in the field, by means of pathogenicity tests. Disease incidence and severity percentages were transformed to area under the disease progress curve (AUDPC), these diseases presented an annual average incidence and severity of 35.33% (AUDPC= 14180) and 39.16% (AUDPC=12885) for leaf spot, 19.5% (AUDPC= 7123) and 55.83% (AUDPC= 20380) for anthracnose, respectively.

**Key words:** Palmae, Areaceae, leaf spot, anthracnose.

The Palmae family (Arecaceae) is classified into six subfamilies with 4,000 species and 200 genera worldwide (Ahmad *et al.*, 2020). Palms present a morphological and ecological diversity, and they are usually found in regions with tropical, subtropical and Mediterranean climates. For the most part, palms are used for esthetic and ornamental purposes, but some species are also used for food (Howard, 2001). In the horticultural industry, ornamental palms represent 404 million dollars, that is, 10% of the total production (Hodges *et al.*, 2011). In addition, from the ecological standpoint, these plants reduce

*Neopestalotiopsis* sp. en síntomas de mancha foliar y *Colletotricum karstii* en antracnosis, ambos patógenos reprodujeron los mismos síntomas observados en campo, a través de las pruebas de patogenicidad. Los porcentajes de incidencia y severidad de las enfermedades se transformaron a área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), estas enfermedades presentaron un promedio anual de incidencia y severidad de 35.33% (ABCPE= 14180) y 39.16% (ABCPE=12885) para mancha foliar, 19.5% (ABCPE= 7123) y 55.83% (ABCPE= 20380) para antracnosis, respectivamente.

**Palabras clave:** Palmae, Areaceae, mancha foliar, antracnosis.

La familia Palmae (Arecaceae) se clasifica en seis subfamilias con 4000 especies y 200 géneros en todo el mundo (Ahmad *et al.*, 2020). Las palmas presentan una diversidad morfológica y ecológica, se encuentran habitualmente en regiones climáticas tropicales, subtropicales y mediterráneas. En su mayoría, las palmas se usan con fines estéticos y de ornato, pero algunas especies se utilizan también para alimentación (Howard, 2001). En la industria hortícola, las palmas ornamentales representan 404 millones de dólares, es decir, el 10% de la producción total (Hodges *et al.*, 2011). Además, desde el punto de vista ecológico estas plantas disminuyen la contaminación ambiental y tienen un efecto positivo en la atmósfera (El-Juhany, 2010). Las palmas ornamentales son afectadas por factores bióticos, como los insectos y las enfermedades, y abióticos, como la temperatura, la nutrición y la composición del suelo (Schmidhuber y Tubiello, 2007; Aldana *et al.*, 2009). Diferentes hongos fitopatógenos, bacterias, virus y nematodos reducen el valor estético de las palmas en diferentes etapas, provocando síntomas que incluyen marchitez, tizón, manchas,

environmental pollution and have a positive effect on the atmosphere (El-Juhany, 2010). Ornamental palms are affected by biotic factors, such as insects and diseases, and abiotic factors such as temperature, and soil nutrition and composition (Schmidhuber and Tubiello, 2007; Aldana *et al.*, 2009). Different phytopathogenic fungi, bacteria, viruses and nematodes reduce the esthetic value of plants in different stages, causing symptoms that include wilting, blight, spot, root rot, stem and petiole rot, diamond scale and leaf sheath diseases, as well as wilting from *Fusarium oxysporum* (Broschat *et al.*, 2014). Recent studies carried out on *Chamaedorea cataractarum*, *C. seifrizii* and *C. costaricana* reported some pathogens responsible for the diseases of these palms, as in *Ganoderma* spp., which causes stem base rot, a lethal disease with an enormous potential for spreading (Shakeel *et al.*, 2020). Another one of the main pathogens in palms is *Phytophthora palmivora*, which causes the devastating disease called lethal palm bud rot (Broschat *et al.*, 2014; Shakeel *et al.*, 2020). Likewise, there have been reports of the leaf spot disease complex *Helminthosporium*, caused by a group of fungi (*Drechslera setariae*, *Exserohilum rostratum* and *Phaeotrichoconis crotalariae*) (Shakeel *et al.*, 2020).

In Central America, the genus *Chamaedorea* is distributed in Guatemala, El Salvador, Honduras and in southern Mexico, as part of the montane cloud forest and tropical evergreen forest (Granados *et al.*, 2004; López *et al.*, 2005). In Chiapas, the genus *Chamaedorea* is found in depressions of the Sierra Madre de Chiapas and in the Lacandona jungle (Buda Arango *et al.*, 2014) in altitudes ranging from 900 to 2300 masl (Martínez *et al.*, 2011). For the case of the region known as the Frailesca, Chiapas, *Chamaedorea quezalteca*, commonly known as the camedor palm, is the most planted species for commercial use.

podredumbre de la raíz, podredumbre del tallo y del pecíolo, cascarilla de diamante y enfermedades de la vaina de la hoja, así como marchitamiento por *Fusarium oxysporum* (Broschat *et al.*, 2014). Estudios recientes realizados en *Chamaedorea cataractarum*, *C. seifrizii* y *C. costaricana* reportaron algunos patógenos responsables de las enfermedades en estas palmas, como *Ganoderma* spp., causante de la podredumbre basal del tallo, enfermedad letal que tiene un enorme potencial de propagación (Shakeel *et al.*, 2020). Otro de los principales patógenos de las palmas es *Phytophthora palmivora*, que provoca la enfermedad devastadora denominada pudrición letal del cogollo de las palmas (Broschat *et al.*, 2014; Shakeel *et al.*, 2020). Así mismo, se ha reportado la enfermedad de mancha foliar complejo *Helminthosporium*, provocado por un grupo de hongos (*Drechslera setariae*, *Exserohilum rostratum* y *Phaeotrichoconis crotalariae*) (Shakeel *et al.*, 2020).

En centroamérica el género *Chamaedorea* se distribuye en Guatemala, El Salvador, Honduras y al sur de México, formando parte del bosque mesófilo de montaña y del bosque tropical perennifolio (Granados *et al.*, 2004; López *et al.*, 2005). En Chiapas, el género *Chamaedorea* se localiza en las depresiones de la Sierra Madre de Chiapas y en la Selva Lacandona (Buda Arango *et al.*, 2014) en altitudes que van desde los 900 a 2300 msnm (Martínez *et al.*, 2011). Para el caso de la región Frailesca, Chiapas, *Chamaedorea quezalteca* conocida comúnmente como palma camedor es la especie que más se cultiva para su uso comercial.

*Chamaedorea quezalteca* se ha extraído desde los años cuarenta para abastecer los mercados florísticos internacionales, primordialmente a Estados Unidos, por lo que actualmente se le ha considerado como un producto forestal no maderable (PFNM) (Pérez *et al.*, 2012), esta actividad económica resulta factible para pequeñas comunidades rurales,

*Chamaedorea quezalteca* has been extracted since the 1940s to supply world flower markets, mainly in the United States, therefore it has been considered a non-timber yielding product (Pérez *et al.*, 2012). This economic activity is feasible for small rural communities, since it does not require sophisticated technology (Evans, 1993). For many rural producers, this represents participating in a subsistence economy towards a market economy, which has meant the increase of their income.

Since 2020, in the Frailesca region, Chiapas, the camedor palm plantations have been affected by two foliar diseases foliar spot and anthracnose which reduce the production and quality of leaves, which has a direct impact on the incomes of producers. In Mexico there are currently no reports of leaf diseases related to the camedor palm (*Chamaedorea quezalteca*). Therefore, the aims of this research were to identify the causal agents, quantify the incidence and severity of the leaf diseases leaf spot and anthracnose in commercial camedor palm plantations.

## MATERIALS AND METHODS

**Gathering biological material.** Twenty leaf samples of each of the leaf spot and anthracnose diseases were gathered from eight-year-old camedor palms located in the Sierra Morena (16° 08'51.6" LN – 93° 36' 30.06" LW) and Plan de Ayala (15°90'47.22" LN-93°21'25.00" LW) *ejidos* of the municipal area of Villa Corzo, Chiapas. The samples were placed in plastic bags with paper towels, labeled and sent to the Laboratory of Biofertilizers and Bioinsecticides of the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas in Villa Corzo, and they were stored in a container with water until used.

ya que no requiere tecnología sofisticada (Evans, 1993). Esto representa para varios productores rurales la participación en una economía de subsistencia hacia una economía de mercado, lo que ha significado el aumento de sus ingresos económicos. Desde el 2020, en la región Frailesca Chiapas, las plantaciones de palma camedor son afectadas por dos enfermedades foliares, mancha foliar y antracnosis, que disminuyen la producción y la calidad de las hojas, lo que impacta directamente el ingreso económico de los productores. Actualmente en México no se cuenta con ningún reporte de enfermedades foliares asociadas a la palma camedor (*Chamaedorea quezalteca*). Por lo que los objetivos de esta investigación fueron identificar los agentes causales, cuantificar la incidencia y severidad de las enfermedades foliares, mancha foliar y antracnosis en plantaciones comerciales de palma camedor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta de material biológico.** 20 muestras de hojas de cada una de las enfermedades de mancha foliar y antracnosis se colectaron en plantaciones de palma camedor de ocho años de edad ubicados en los Ejidos Sierra Morena (16° 08'51.6" LN – 93° 36' 30.06" LW) y Plan de Ayala (15°90'47.22" LN-93°21'25.00" LW) del municipio de Villa Corzo, Chiapas. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico acondicionadas con papel absorbente, se etiquetaron y trasladaron al Laboratorio de Biofertilizantes y Bioinsecticidas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Sede Villa Corzo y se conservaron en un recipiente con agua hasta su uso.

**Aislamiento y purificación de los hongos.** Las hojas de palma camedor con síntomas de mancha

**Fungus isolation and purification.** The camedor palm leaves with symptoms of leaf spot and anthracnose were dissected into pieces of 0.5 cm<sup>2</sup> each, washed with 70% ethanol for 3 minutes and with 10% sodium hypochlorite for 10 min, then washed twice with sterile distilled water for 2 min. Ten pieces with each of the symptoms were planted in a potato dextrose agar (PDA) medium in triplicate and incubated at 28 °C, a 12:12 light/darkness photoperiod for 10 days; the mycelial growth of the fungi was monitored every 24 hours and purified by hyphal tipping and monosporic culture (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

**Morphological identification.** Out of the 30 pieces of tissue planted in PDA, 10 fungi were isolated from each of the symptoms of leaf spot and anthracnose that were the first to emerge from the tissues after 48 hours. They were identified morphologically at a genus level via their reproductive structures observed under an optical microscope (Axiolab 5, Carl Zeiss) and with the aid of taxonomical keys (Barnett and Hunter, 2006; Watanabe, 2002).

**Molecular identification.** For the molecular identification, the fungus isolated from the leaves with symptoms of leaf spot and the anthracnose fungus were planted in Petri dishes with PDA covered with a sheet of sterile cellophane and incubated for 7 days at 28 °C. The mycelium was harvested and frozen using liquid nitrogen; the DNA was then extracted following the protocol by Raeder and Broda (1989). The total DNA was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) of the 18S of the rDNA using oligos ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') with the following conditions of amplification from an initial denaturing step at 94 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles (denaturation at 94 °C for

foliar y antracnosis se diseccionaron en trozos de 0.5 cm<sup>2</sup>, se lavaron con etanol al 70 % por 3 minutos y con hipoclorito de sodio al 10 % por 10 min, posteriormente se lavaron dos veces con agua destilada estéril por 2 min. Se sembraron 10 trozos de cada uno de los síntomas en medio papa dextrosa agar (PDA) por triplicado e incubados a 28 °C, fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad por 10 días, el crecimiento micelial de los hongos fue monitoreado cada 24 horas y purificados por punta de hifa y cultivo monospórico (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

**Identificación morfológica.** De los 30 trozos de tejido sembrados en PDA se aislaron 10 hongos de cada uno de los síntomas de mancha foliar y antracnosis que fueron los primeros que emergieron de los tejidos después de 48 h, se identificaron morfológicamente a nivel de género mediante sus estructuras de reproducción observadas en un microscopio óptico (Axiolab 5, Carl Zeiss) y con el apoyo de claves taxonómicas (Barnett and Hunter, 2006; Watanabe, 2002).

**Identificación molecular.** Para la identificación molecular, el hongo aislado de las hojas con síntomas de mancha foliar y el hongo de antracnosis se sembraron en cajas petri con PDA cubierto con un celofán estéril y se incubó por 7 días a 28 °C. El micelio fue cosechado y congelado con nitrógeno líquido, se extrajo el ADN siguiendo el protocolo de Raeder and Broda (1989). El ADN total se utilizó para amplificar el espaciador de transcrito interno (ITS) del 18S del rADN utilizando los oligos ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') con las siguientes condiciones de amplificación de una etapa inicial de desnaturalización de 94 °C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos (extensión 94 °C 30 s, alineamiento 60 °C 30 s, extensión 72 °C por 45 s) y una extensión final de 72 °C por 10 minutos,

30 s, annealing at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s) and a final extension of 72 °C for 10 minutes, where the fragment may be from 710 to 850 pb, depending on the fungal species (White *et al.*, 1990). The amplicons of the polymerase chain reaction (PCR) were sequenced by the Sanger method in an ABI (Applied Biosystems) sequencer. The sequences were compared with the NCBI data base using the de BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990).

**Pathogenicity test.** Koch's postulates were carried out on fields under the shade in the facilities of the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), using two-year old seedlings planted in 5 kg polyethylene bags and natural soil substrate from the same plantations. Both fungi isolated and previously identified were planted in a PDA medium at 28 °C in a 12:12 light/darkness photoperiod for 15 days. The inoculation of *Neopestalotiopsis* sp. was carried out directly and consisted in taking the conidia from the acervuli with a hypodermic needle and inoculating the leaves of the plants via a small lesion in the epidermis (Rebollar *et al.*, 2020), and for *C. karstii*, a conidial solution was used with  $1 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  and 10  $\mu\text{L}$  were inoculated. For both fungi, five plants were inoculated (two leaves per plant). The inoculated plants were sprayed with sterile distilled water, covered with plastic bags and were uncovered on the third day. They were kept under regular irrigation and observation until the symptoms of the diseases appeared. Samples were taken from the symptoms obtained and the inoculated fungi were reisolated, following the process described above. Five control plants were used with sterile water and the experiment was carried out in duplicate.

**Field incidence and severity.** To quantify the incidence of the leaf diseases in the camedor palm,

donde el fragmento puede ser de 710 a 850 pb según la especie de hongo (White *et al.*, 1990). Los amplicones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron secuenciados por el método de Sanger en un secuenciador ABI (Applied Biosystems). Las secuencias fueron comparadas con la base de datos NCBI usando el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

**Prueba de patogenicidad.** Los postulados de Koch se realizaron en condiciones de campo bajo sombra en las instalaciones de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), se usaron plántulas de dos años de edad sembradas en bolsa de polietileno de 5 kg y sustrato suelo natural de las mismas plantaciones. Los dos hongos aislados e identificados previamente se cultivaron en medio PDA a 28 °C fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad por 15 días. La inoculación de *Neopestalotiopsis* sp. se realizó de manera directa y consistió en tomar los picnidios de los acérvulos con una aguja hipodérmica e inocular las hojas de las plantas a través de una ligera herida a la epidermis (Rebollar *et al.*, 2020) y para *C. karstii* se utilizó una solución de conidias de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  y se inocularon 10  $\mu\text{L}$ . Para ambos hongos se inocularon cinco plantas (dos hojas por planta). Las plantas inoculadas se asperjaron agua destilada estéril, se cubrieron con bolsas de plástico y se descubrieron al tercer día. Se mantuvieron en irrigaciones regulares y en observación hasta que aparecieron los síntomas de las enfermedades. De los síntomas obtenidos se tomaron muestras y se reaislaron los hongos inoculados siguiendo el protocolo previamente descrito. Se utilizaron cinco plantas control inoculadas con agua estéril y el experimento se realizó por duplicado.

**Incidencia y severidad en campo.** Para cuantificar la incidencia de las enfermedades foliares de palma camedor, se seleccionó una parcela de 1 ha de ocho



a 1 ha, eight-year-old plot in the Sierra Morena *ejido* was chosen, a five-point sampling was carried out, 20 plants were labeled and sampled in each point, the number of plants with symptoms were quantified out of a total of 100, samples were taken every 2 months in a year in the same points and the same plants and in each one, the values of the five points were averaged. For the severity of the diseases, a pictographic scale of damages was created with values from 1 to 5, where 1 represents 0% damage; 2, 1-25% damage; 3, 26-50% damage; 4, 51-75% damage and 5, 76-100% damage (Figure 1). The percentage of damage was measured directly from each of the plants quantified in the incidence

años de edad ubicada en el ejido Sierra Morena, se hizo un muestreo de cinco de oros, en cada punto se etiquetaron y muestrearon 20 plantas, se cuantificó el número de plantas con síntomas de un total de 100 plantas, los muestreos se realizaron cada dos meses durante un año en los mismos puntos y mismas plantas y en cada uno se promedió los valores de los cinco puntos. Para la severidad de las enfermedades se construyó una escala pictográfica de daño con valores de 1-5; donde 1 representa (0% de daño), 2 (1-25% de daño), 3 (26-50% de daño), 4 (51-75% de daño) y 5 (76-100% de daño) (Figura 1), el porcentaje de daño se midió de manera directa de cada una de las plantas cuantificadas en la

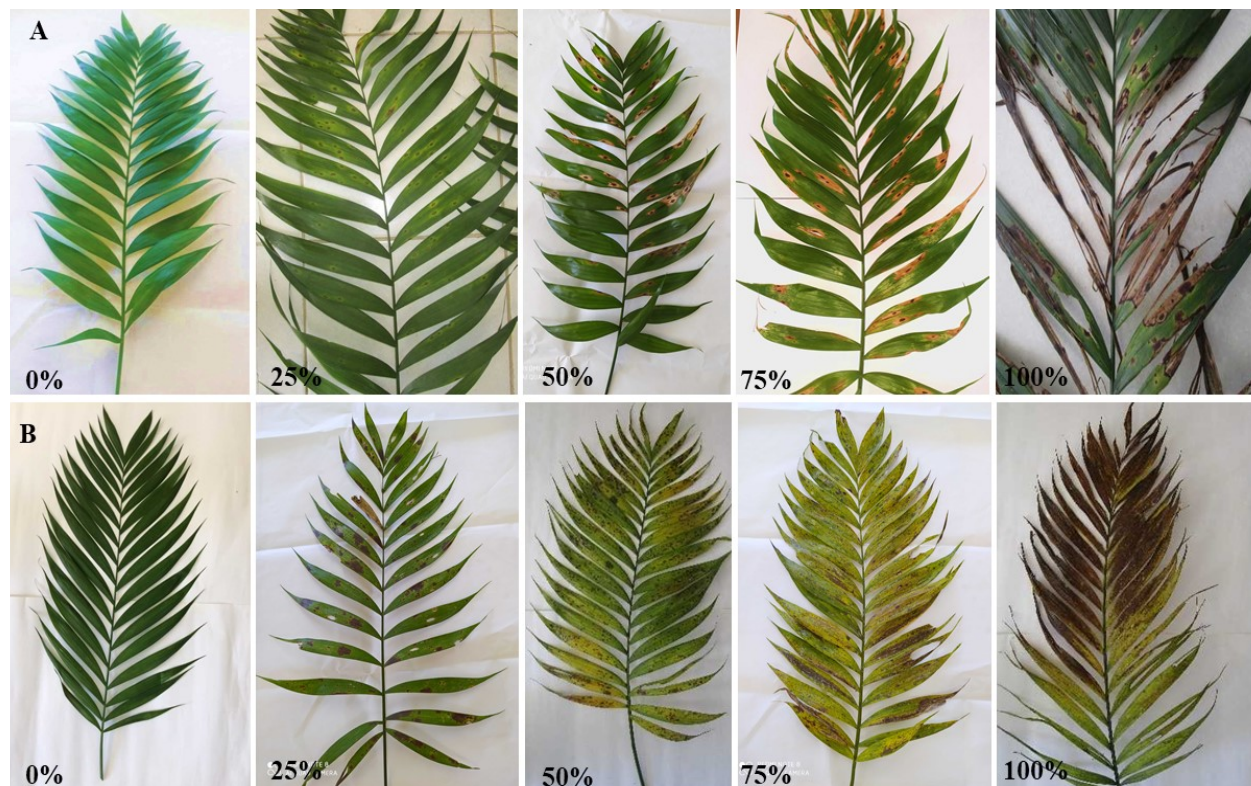


Figure 1. Pictographic damage scales with values from 1 to 5, where 1 represents 0% damage; 2, 1-25% damage; 3, 26-50% damage; 4, 51-75% damage and 5, 76-100% damage for foliar spot (A) and anthracnose (B) diseases.

Figura 1. Escalas pictográficas de daño con valores de 1-5, donde 1 representa (0% de daño), 2 (1-25% de daño), 3 (26-50% de daño), 4 (51-75% de daño) y 5 (76-100% de daño) para las enfermedades mancha foliar (A) y antracnosis (B).

of the disease. The percentages of incidence and severity of the disease were converted into values of areas under the disease progress curve (AUDPC) (Pedroza and Samaniego, 2009).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological and molecular identification.

Out of the leaves with symptoms of leaf spot, 10 fungal cultures were isolated and purified, which, based on morphological analyses formed on PDA medium, all were identified as *Neopestalotiopsis* sp., since they displayed characteristics of cottonlike filamentous fungi with elevated, initially white hyphae, acervuli that look like small black pustules with abundant spindle-shaped conidia with three central pigmented cells and hyaline basals (dimensions from 13.22 to 15.88  $\mu\text{m}$  in length x 2.82 to 3.59  $\mu\text{m}$  in width), with two to four apical appendages (measuring 5.99 x 8.49  $\mu\text{m}$  in length x 0.67 x 1.21  $\mu\text{m}$  in width) and a peduncle in the basal cells (Barnett and Hunter, 2006; Watanabe, 2002) (Figure 2). Structures with similar characteristics were reported by Rebollar *et al.* (2020) in strawberry crops and by Gerardo-Lugo *et al.* (2020) in mango crops: three central cells colored yellow and 3 apical appendages with a peduncle in the basal cells. However, the morphological characteristics of the phytopathogenic fungi, and particularly *Neopestalotiopsis* can vary and be modified by the environmental conditions and these are not reliable as a form of identification (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Studies carried out by Acosta-González (2022) confirm that there are differences in the diameter of the final growth, as well as coloring, the texture of the mycelium, the production of acervuli, the elevation of the mycelium and the margins of the genus *Neopestalotiopsis*. Molecular identification was based on the analysis of the

incidencia de la enfermedad. Los porcentajes de incidencia y severidad de la enfermedad se transformaron a valores de áreas bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) (Pedroza y Samaniego, 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación morfológica y molecular.** De las hojas con síntomas de mancha foliar se aisló y purificó 10 colonias de hongos, que con base a los análisis morfológicos formadas en medio PDA todas fueron identificadas como *Neopestalotiopsis* sp., ya que presentaron características de hongo filamentoso algodonoso con hifas elevadas inicialmente de color blanco, acérvulos que parecen pequeñas pústulas de color negro brillante con abundante conidios de forma fusiformes con tres células centrales pigmentadas y las basales hialinas (dimensiones de 13.22 a 15.88  $\mu\text{m}$  de longitud x 2.82 a 3.59  $\mu\text{m}$  de ancho), con dos a cuatro sétulas apicales (medidas 5.99 x 8.49  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.67 x 1.21  $\mu\text{m}$  de ancho) y un pedicelo en las células basales (Barnett and Hunter, 2006; Watanabe, 2002) (Figura 2). Estructuras con características similares fueron reportadas por Rebollar *et al.* (2020) en cultivo de fresa y Gerardo-Lugo *et al.* (2020) en cultivo de mango, tres células centrales pigmentadas de color amarillo y 3 sétulas apicales con un pedicelo en las células basales; sin embargo, las características morfológicas de los hongos fitopatógenos y en especial *Neopestalotiopsis* pueden variar y ser modificadas por las condiciones ambientales y estas no son confiables como medio de identificación (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Estudios realizados por Acosta-González (2022) confirman que hay diferencias en el diámetro del crecimiento final, así como la coloración, la textura del micelio, la producción de acérvulos, la elevación del micelio

consensus sequence of gene 18S rDNA (ITS5/ITS4) that displayed a high similarity with *Neopestalotiopsis* sp. with a coverage of 99% and a percentage of similarity of 99.48%, the sequence was registered in the GenBank with accession number ON860658 (White *et al.*, 1990).

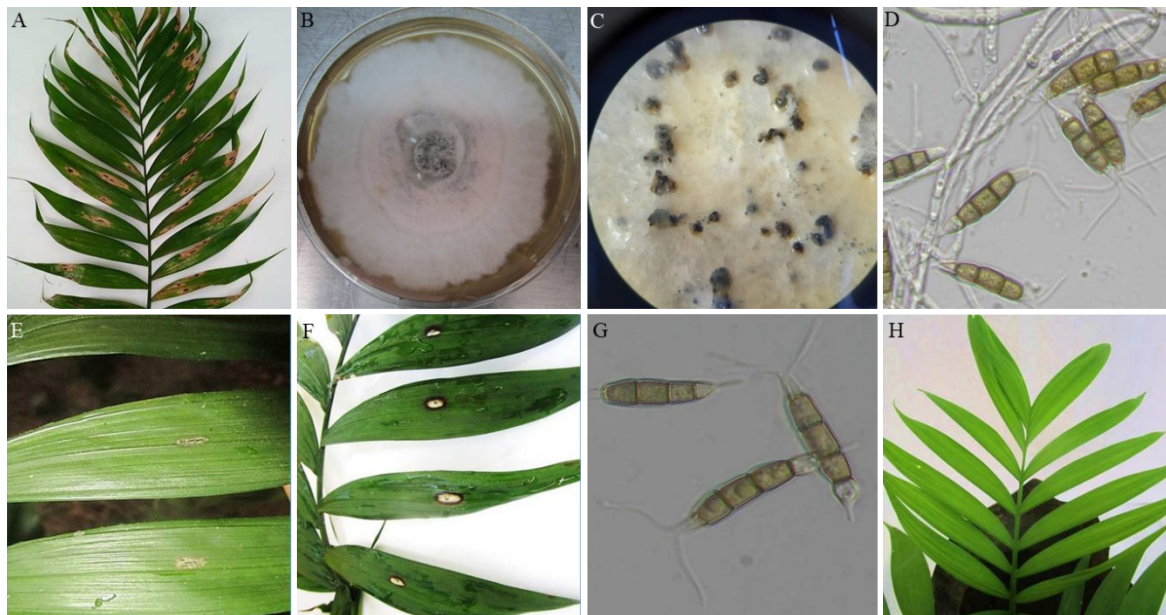
For the symptom of anthracnose, *Colletotrichum karstii* was identified as the causal agent, and the identification was carried out from 10 frequent fungal isolations, which were characterized for being filamentous, for the cultures forming asexual reproduction sporodochia with pale maroon semi-spherical hyaline conidia, either simple or branched or erect (dimensions 6.47 to 8.59  $\mu\text{m}$  in length x 2.69 to 3.31  $\mu\text{m}$  in width), conidiophores 17.04 to 33.35  $\mu\text{m}$  in height (Barnett and Hunter, 2006; Watanabe, 2002) (Figure 3). Similar characteristics to this fungus were reported in other crops such as strawberries in Brazil (Soares, 2021) and papaya crops in Mexico (Pacheco *et al.*, 2022). The molecular identification was obtained by the amplification of gene 18S rDNA (ITS5/ITS4), which displayed a high level of similarity with *Colletotrichum karstii* with a coverage of 100% and a percentage of similarity of 99.83%; it was registered in the GenBank with accession number ON799261 (White *et al.*, 1990).

**Pathogenicity tests.** The plants inoculated with *Neopestalotiopsis* sp. presented the first symptoms of leaf spot after four days, and after eight days, the symptoms of small, oval-shaped spots with a black dot in the middle were marked and defined, just like those observed in the field. The control presented no symptoms. The plants with symptoms were used to reisolate the pathogen and *Neopestalotiopsis* sp. was confirmed as the leaf spot disease (Figure 2). These results agree with those reported by Khoo *et al.* (2022), who found that *Ixora chinensis* plants inoculated with

and the margins of the genus *Neopestalotiopsis*. La identificación molecular se basó en el análisis de la secuencia consenso del gen 18S rDNA (ITS5/ITS4) que presentó una alta similitud con *Neopestalotiopsis* sp. con una cobertura de 99% y un porcentaje de similitud de 99.48%, la secuencia fue registrada en el GenBank con número de acceso ON860658 (White *et al.*, 1990).

Para el síntoma de antracnosis se identificó a *Colletotrichum karstii* como agente causal de esta enfermedad, la identificación se realizó a partir de 10 aislamientos frecuentes de hongos las cuales se caracterizan por ser filamentoso, las colonias forman esporodocios de reproducción asexual con conidios hialinos, marrón pálido semi esféricos, simples o ramificados o erectos (dimensiones de 6.47 a 8.59  $\mu\text{m}$  de longitud x 2.69 a 3.31  $\mu\text{m}$  de ancho), conidióforos de 17.04 a 33.35  $\mu\text{m}$  de altura (Barnett and Hunter, 2006; Watanabe, 2002) (Figura 3). Características similares de este hongo fueron reportados en otros cultivos como la fresa en Brasil (Soares, 2021) y cultivo de papaya en México (Pacheco *et al.*, 2022). La identificación molecular se obtuvo a través del análisis de la secuencia consenso obtenida por la amplificación del gen 18S rDNA (ITS5/ITS4) que presentó alta similitud con *Colletotrichum karstii* con una cobertura de 100% y un porcentaje de similitud de 99.83%, se registró en el GenBank con el número de acceso ON799261 (White *et al.*, 1990).

**Pruebas de patogenicidad.** Las plantas inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp. presentaron los primeros síntomas de mancha foliar a los cuatro días posteriores y a los ocho días, los síntomas de pequeñas manchas ovaladas con un punto negro en el centro fueron marcados y definidos, iguales a los observados en campo. El control no presentó ninguna sintomatología. Las plantas con síntomas se utilizaron para reaislar el patógeno y se corroboró



**Figure 2.** Symptoms of foliar spot in camedor palm leaves in the field, light brown oval-shaped spots with a black dot in the center, affecting the folioles of the leaf (A), maroon-white culture with cottonlike mycelia and abundant acervuli in the center (B), bright black acervuli with abundant conidia (C) and conidia with three pigmented cells in the center and hyalin basals, with apical appendages and basal pedicel (D) *Neopestalotiopsis* sp formed in PDA, symptoms presented four (E) and eight (F) days after inoculation, reisolated conidia produced in PDA from pathogenicity tests (E) and control plant (F).

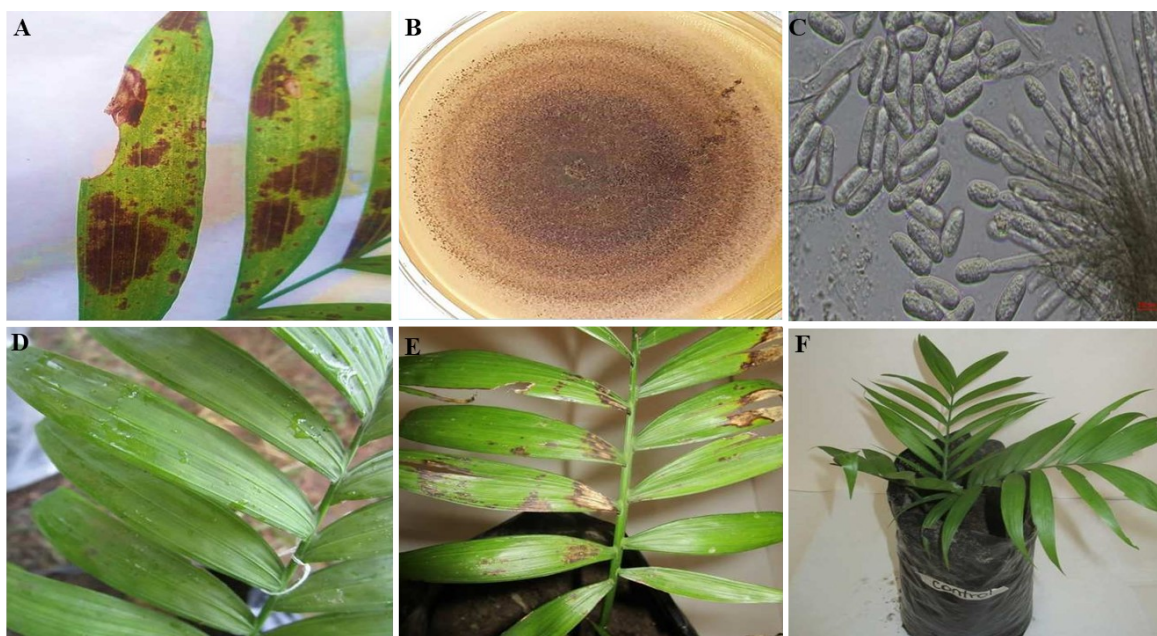
**Figura 2.** Síntoma de manchas foliar en hojas de palma camedor en campo, manchas ovaladas de color café claro con un punto negro en el centro afectando a los foliolos de la hoja (A), colonia blanca-marrón con micelio algodónoso y abundante acérvulos en el centro (B), acérvulos de color negro brillante con abundante conidios (C) y conidios con tres células pigmentadas en el centro y basales hialinas, con séptulas apicales y pedicelo basal (D) de *Neopestalotiopsis* sp formadas en PDA, síntomas presentados a los cuatro (E) y ocho (F) días después de la inoculación, conidias reaisladas producidas en PDA de las pruebas de patogenicidad (E) y planta control (F).

*Neopestalotiopsis cubana* presented symptoms after seven days, whereas mango plant inoculated with *Neopestalotiopsis* sp., and strawberry plants inoculated with *Neopestalotiopsis rosae* presented symptoms 10 days after inoculation (Gerardo-Lugo *et al.*, 2020; Rebollar *et al.*, 2020).

In the pathogenicity test with the fungus *Colletotrichum karstii*, the symptoms of anthracnose became apparent on the third day, with small undefined dark brown spots, and after 11 days, the irregular spots were well defined, reproducing the same symptoms displayed on the field; the fungus was reisolated and identified as *C. karstii* (Figure 3). According to reports by Ayvar-

que *Neopestalotiopsis* sp. es el agente causal de la enfermedad de mancha foliar (Figura 2). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Khoo *et al.* (2022) que encontró que las plantas de *Ixora chinensis* inoculadas con *Neopestalotiopsis cubana* manifestaron los síntomas a los siete días, mientras que las plantas de mango inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp., y de fresa inoculadas con *Neopestalotiopsis rosae* presentaron los síntomas a los 10 días después de la inoculación (Gerardo-Lugo *et al.*, 2020; Rebollar *et al.*, 2020).

En la prueba de patogenicidad con el hongo *Colletotrichum karstii*, los síntomas de antracnosis se manifestaron a partir del tercer día con pequeñas



**Figure 3.** Symptom of anthracnose in camedor palm in the field, irregular black spots affect the leaf folioles (A), pale brown colony with abundant sporodochia (B), semi-spherical conidiophores and hyaline conidia (C) of *Colletotrichum karstii* formed in PDA, symptoms manifested after three (D) and 11 days (E) after the inoculation of the pathogenicity test and control plant (F).

**Figura 3.** Síntoma de antracnosis en palma camedor en campo, manchas irregulares de color negro afectando a los foliolos de la hoja (A), colonia de color marrón pálido con abundante esporodocios (B), conidióforos y conidios hialinos semiesféricos (C) de *Colletotrichum karstii* formadas en PDA, síntomas manifestados a los tres (D) y 11 días (E) después de la inoculación de la prueba de patogenicidad y planta control (F).

Serna *et al.* (2021), avocado fruits inoculated with the same pathogen displayed symptoms after five days, whereas Fernández-Herrera (2020) coincided that symptoms begin displaying three days after inoculation in *Dendrobium nobile* orchid plants, and seven days later in chili pepper plants (Saini *et al.*, 2016).

**Field incidence and severity.** During the sampling period on the field for the disease caused by *Neopestalotiopsis* sp., the incidence and severity were observed to have an intensity that depended on the weather and management during the progress of the disease (Figure 4). For the month of June, an incidence of 12% was recorded (AUDPC=732), corresponding to one of the driest months of summer sampling, whereas in August,

manchas café oscuras poco definidas y a los 11 días las manchas irregulares estaban bien marcadas reproduciendo los mismos síntomas observados en campo, el hongo fue reaislado e identificado como *C. karstii* (Figura 3). De acuerdo a lo reportado por Ayvar-Serna *et al.* (2021) en frutos de aguacate inoculados con el mismo patógeno manifestaron los síntomas a los cinco días, por su parte Fernández-Herrera (2020) coincide en que los síntomas se empiezan a manifestarse a los tres días posteriores a la inoculación en plantas de orquídeas de *Dendrobium nobile* y a los siete días en frutos de chile (Saini *et al.*, 2016).

**Incidencia y severidad en campo.** Durante el período de muestreo en campo de la enfermedad ocasionada por *Neopestalotiopsis* sp. se observó

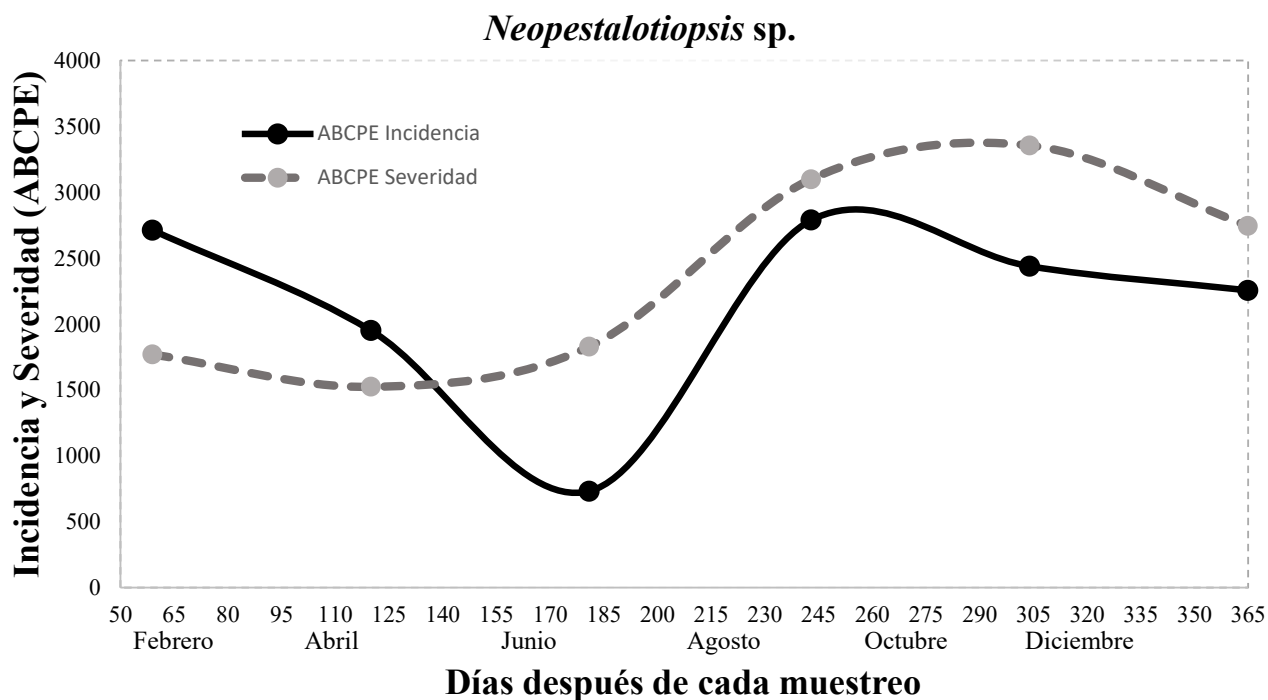


Figure 4. Incidence and severity (area under the disease progress curve) of leaf spot caused by *Neopestalotiopsis* sp. in eight-year-old commercial camedor palm plantations in the year 2021.

Figura 4. Incidencia y severidad (área bajo la curva del progreso de la enfermedad) de la mancha foliar provocada por *Neopestalotiopsis* sp. en plantaciones comerciales de palma camedor de ocho años de edad en el año 2021.

corresponding to the humid season due to rains and the highest anthropogenic activity due to the trimming of palm leaves, the highest value (45%) was presented (AUDPC= 2790). For severity, a similar behavior to incidence was displayed, in which the driest month was April, with a severity of 25% (AUDPC =1525), whereas the rainiest and most humid month was October, with 50% (AUDPC = 3355) (Figure 4). In this sense, it has been reported that in the leaf spot disease caused by *Neopestalotiopsis* in eucalyptus leaves, lesions are most severe when the interaction of the pathogen and the plant are exposed to prolonged humidity periods (Belisario *et al.*, 2019). According to reports by Maharachchikumbura *et al.* (2011), incidence and

que la incidencia y la severidad presentaron una intensidad dependiente del clima y manejo durante el progreso de la enfermedad (Figura 4). Para el mes de junio se registró una incidencia de 12% (ABCPE=732), correspondiente a uno de los meses más secos de muestreo de verano, mientras que en agosto correspondiente a la temporada húmeda por las lluvias y de mayor actividad antropogénica por los cortes de hojas de palma, se presentó el valor más alto 45% (ABCPE= 2790). Para la severidad se registró un comportamiento similar a la incidencia, el mes más seco abril, se registró 25% de severidad (ABCPE=1525), mientras que el mes mas lluvioso y húmedo octubre 50% (ABCPE= 3355) (Figura 4). En este sentido se ha reportado que la enfermedad

severity are related to the thickness of the leaf and the stage of maturation of leaves, since the hyphae penetrate the spaces between the cells of leaved when they are in a state of maturity, therefore their susceptibility also depends on the thickness of the cuticle and on the production of phytotoxins such as pestalopyrones, hydroxypestalopyrones and pestalocides. It is worth pointing out that, although a minimum incidence of 12% and severity of 25%, palms cannot be marketed, since the commercial part of the camedor palm is comprised of its leaves, and the slightest damage they have stops them from complying the quality standards established by the market, according to De los Santos (2005), in the market report for camedor palm in Mexico.

Regarding the behavior of the disease caused by *Colletotrichum karstii* in the month of June, an incidence of 13% was displayed (AUDPC= 793), which corresponds to a hot season and the start of the rainy season in the region, whereas the highest value was registered in December, with 37% (AUDPC= 2257), a season with cool temperatures and a high relative humidity (Figure 5). Regarding severity, the disease had a similar behavior to that of incidence, where the highest value was recorded in June, with 35% (AUDPC= 2135), and in August to October, when temperatures are cooler with a high relative humidity due to heavy rainfalls, severity was 65% (AUDPC= 4030) and 75% (AUDPC = 4575) respectively (Figure 5). In this sense, environmental factors are important for the dissemination and progress of the disease, mostly relative humidity and rainfall play a part in the epidemiology of *Colletotrichum karstii* in citrus orchards (Mayorking *et al.*, 2019). Studies performed by Velho *et al.* (2014) mention that the incidence and severity caused by this pathogen can defoliate apple trees and it is favored by high levels of humidity and high temperatures. Likewise, *Colletotrichum* and *Pestalotiopsis* have been

de manchas foliares provocada por *Neopestalotiopsis* en hojas de eucalipto, las lesiones son mas severas cuando la interacción del patógeno y la plantas se exponen a periodos prolongados de humedad (Belisario *et al.*, 2019). Según lo reportado por Maharachchikumbura *et al.* (2011) la incidencia y la severidad están asociadas al grosor de la lámina foliar y a la etapa de maduración de las hojas ya que las hifas penetran en los espacios de las células de las hojas cuando se encuentran en estado maduro por lo que, la susceptibilidad de éstas, también depende del grosor de la cutícula y de la producción de fitotoxinas como pestalopironas, hidroxipestalopironas y pestalocidos. Es importante señalar que, aunque se haya registrado una incidencia mínima de 12% y severidad del 25% las palmas no pueden ser comercializadas, ya que la parte comercial de la palma camedor son sus hojas y con el mínimo daño que presenten, no cumplen con los estándares de calidad establecidos por el mercado según lo menciona De los Santos (2005), en el informe de mercado de la palma camedor en México.

En cuanto al comportamiento de la enfermedad ocasionada por *Colletotrichum karstii* en el mes de junio se presentó una incidencia de 13% (ABCPE= 793) que corresponde a una estación de calor e inicio de las lluvias en la región, mientras que el valor más alto se registró en el mes de diciembre con 37% (ABCPE= 2257), época que se presentan temperaturas frescas y alta humedad relativa (Figura 5). Con respecto a la severidad la enfermedad tuvo un comportamiento similar al de incidencia donde el valor más bajo se registró en junio con 35% (ABCPE= 2135), y en agosto a octubre donde la temperatura es más fresca con alta humedad relativa por las lluvias torrenciales se presentó una severidad de 65% (ABCPE= 4030) y 75% (ABCPE= 4575) respectivamente (Figura 5). En este sentido, los factores ambientales son importantes para la disseminación y progreso de la enfermedad,

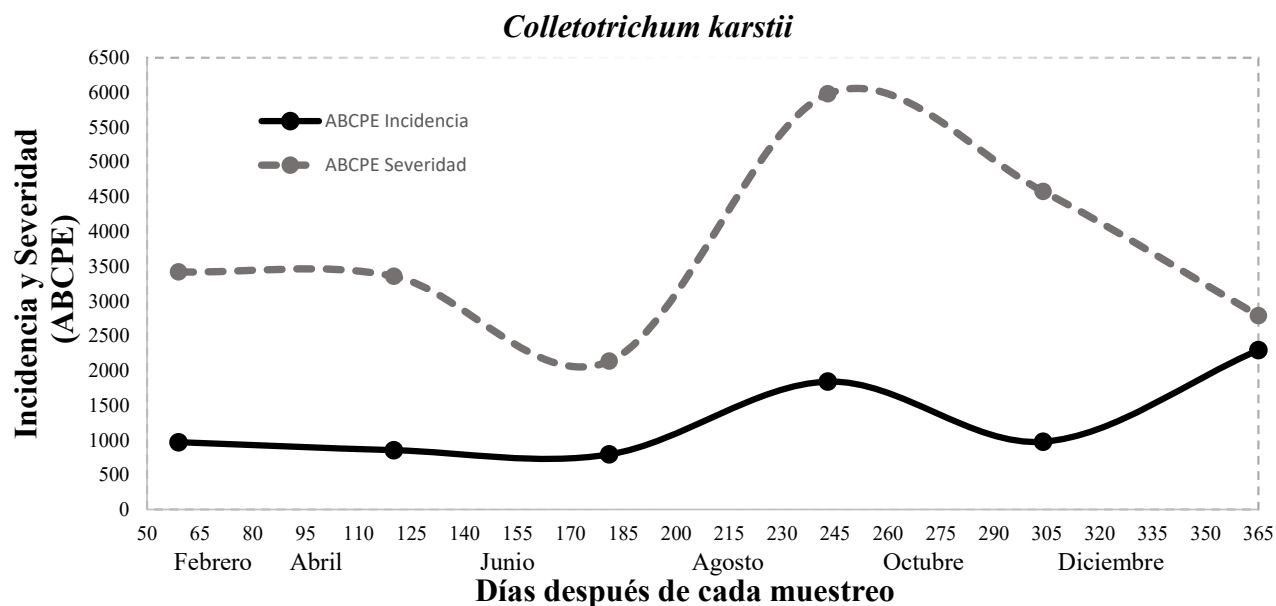


Figure 5. Incidence and severity (area under the disease progress curve) of anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in eight-year-old commercial camedor palm plantations in the year 2021.

Figura 5. Incidencia y severidad (área bajo la curva del progreso de la enfermedad) de antracnosis provocada por *Colletotrichum karstii* en plantaciones comerciales de palma camedor de ocho años de edad en el año 2021.

reported as potential fungi that cause leaf spots in palm, where the disease is disseminated by spores that are easily scattered by wind and rain (Tariq *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONS

According to the morphological, molecular characterizations and pathogenicity tests, *Neopestalotiopsis* sp. has been concluded to be the causal agent of leaf spots and *Colletotrichum karstii* is responsible for the anthracnose disease in

principalmente humedad relativa y precipitación juegan un papel en la epidemiología de *Colletotrichum karstii* en huertos de cítricos (Mayorking *et al.*, 2019). Estudios realizados por Velho *et al.* (2014) mencionan que la incidencia y severidad provocada por este patógeno puede defoliar los árboles de manzana y se ve favorecido por la alta humedad y la temperatura. Asimismo, se ha reportado a *Colletotrichum* y *Pestalotiopsis* como hongos potenciales, agentes causales de manchas foliares en palma donde la enfermedad es diseminada por esporas fácilmente dispersada por el viento y la lluvia (Tariq *et al.*, 2015).



camedor palm. The progress of the incidence and severity of these diseases depend on the factors of relative humidity cause by rains and by agronomic management, which reduces palm quality and production. Therefore, this is the first report in Mexico on these pathogens related to the plantation of camedor palm (*Chamaedorea quezalteca*).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the Plan de Ayala and Sierra Morena *ejidos*, both from the municipal area of Villa Corzo, Chiapas, for collaborating in this research project and to the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo - Unidad Cuauhtémoc Chihuahua (Food and Development Research Center - Cuahutémoc, Chihuahua Unit) for the support in the molecular identification of the pathogens.

#### LITERATURE CITED

- Acosta-González U. 2022. Caracterización de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. y efecto de fungicidas en pre y post-infección en el cultivo de fresa (tesis doctoral), Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. 133p. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/123456789/1443>
- Ahmad I, Saeed HAR and Khan MAS. 2020. Ornamental Horticulture: Economic Importance, Current Scenario and Future Prospects. Pp:3-40. *In*: I. Ul Haq and S. Ijaz, (Eds.), Etiology and Integrated Management of Economically Important Fungal Diseases of Ornamental Palms. Sustainability in Plant and Crop Protection. Vol. 16. Springer, Cham. 274p. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-56330-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-56330-1_1)
- Aldana de la TJA, Aldana de la TR, Calvache GH y Franco BPN. 2009. Manual de plagas de la palma de aceite en Colombia. (en línea) Colombia. Cenipalma. Bogotá, Colombia. 198p. <http://repositorio.fedepalma.org/handle/123456789/107711>.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman JD. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ayvar-Serna S, Díaz-Nájera JF, Vargas-Hernández M, Camacho-Tapia M, Valencia-Rojas GA, Lima NB and Tovar-Pedraza JM. 2021. First report of *Colletotrichum jiangxiense* causing avocado anthracnose in Mexico. *Plant Disease* 105(2): 502. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0459-PDN>

#### CONCLUSIONES

De acuerdo con la caracterización morfológica, molecular y las pruebas de patogenicidad, se concluye que *Neopestalotiopsis* sp. es el agente causal de las manchas foliares y *Colletotrichum karstii* responsable de la enfermedad antracnosis en palma camedor. El progreso de la incidencia y severidad de estas enfermedades son dependientes de los factores de humedad relativa ocasionada por las lluvias y manejo agronómico, esto reduce la calidad y producción de palma, por lo cual, este es el primer reporte en México de estos patógenos asociados al cultivo de palma camedor (*Chamaedorea quezalteca*).

#### AGRADECIMIENTOS

A los ejidos de Plan de Ayala y Sierra Morena, ambos del municipio de Villa Corzo, Chiapas por colaborar en este proyecto de investigación y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo - Unidad Cuauhtémoc Chihuahua por el apoyo en la identificación molecular de los patógenos.

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

- Barnett H and Hunter B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition, The American Phytopathological Society Minnesota, Estados Unidos. 240p.
- Belisário R, Aucique-Pérez CE, Abreu LM, Salcedo SS, de Oliveira WM and Furtado SS. 2019. Infection by *Neopestalotiopsis* spp. occurs on unwounded eucalyptus leaves and is favoured by long periods of leaf wetness. *Plant Pathology* 69: 194-204. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.10.004>
- Broschat TK, Elliott ML and Hodel DR. 2014. Ornamental palms: biology and horticulture. Pp:1-120. *In*: M. H. Meyer, M. S. Reid and D. Swietlik (Eds.), Horticultural reviews. Wiley-Blackwell. 488p. <https://doi.org/10.1002/9781118916827.ch01>
- BudaArango G, Trench Ty Durand L. 2014. El aprovechamiento de palma camedor en la Selva Lacandona, Chiapas, México: ¿Conservación con desarrollo?. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional* 22(44): 199-223.

- De los Santos Espinoza J, Paniagua JL y González A. 2005. Informe de mercado de la palma camedor (*Chamaedorea* spp.). Grupo Mesófilo A.C. Oaxaca México. 26p. [https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08c7240f0b64974001214/R7925i\\_Palma\\_camedora.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08c7240f0b64974001214/R7925i_Palma_camedora.pdf)
- El-Juhany LI. 2010. Degradation of date palm trees and date production in Arab countries: Causes and potential rehabilitation. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(8): 3998–4010. <https://www.researchgate.net/publication/236229832>
- Evans M. 1993. Conservation by commercialization. Pp:815-822. In: C. Hladik A. Hladik O. Linares. H. Pagezy. A. Semple and M. Hadley, (Eds.), *Tropical Forests, People and Food: Biocultural Interactions and Applications to Development*. MAB Series. Vol. 13. UNESCO. 852p.
- Fernández-Herrera E, Rentería-Martínez ME, Ramírez-Bustos II, Moreno-Salazar SF, Ochoa-Meza A and Guillén-Sánchez D. 2020. *Colletotrichum karstii*: causal agent of anthracnose of *Dendrobium nobile* in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 42 (4):514-519. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1731711>
- Gerardo-Lugo SS, Tovar-Pedraza JM, Maharachchikumbura SS, Apodaca-Sánchez MA, Correia KC, Saucedo-Acosta CP and Beltrán-Peña H. 2020. Characterization of *Neopestalotiopsis* species associated with mango grey leaf spot disease in Sinaloa, Mexico. *Pathogens* 9(10): 788. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100788>
- Granados SD, Hernández GMA, López RGF y Santiago LM. 2004. El cultivo de palma camedor (*Chamaedorea* sp.) en sistemas agroforestales de Cuichapa, Veracruz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:233-241. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61027303>
- Hodges RJ, Buzby JC and Bennett B. 2011. Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: opportunities to improve resource use. *The Journal of Agricultural Science* 149:37-45. <https://doi.org/10.1017/S0021859610000936>
- Howard FW. 2001. Insect pests of palms and their control. *Pesticide Outlook*, 12, 240–243. <https://doi.org/10.1039/B110547G>
- Khoo YW, Tan HT, Khaw YS, Li S and Chong KP. 2022. First Report of *Neopestalotiopsis cubana* Causing leaf blight on *Ixora chinensis* in Malaysia. *Plant Disease* 106 (10): 2747. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0277-PDN>
- López C, Chanfon S y Segura G. 2005. La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera. Experiencias de comunidades rurales. Montana, México, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y CIFOR. 200 p. <https://www.cifor.org/knowledge/publication/1890>
- Maharachchikumbura SS, Guo LD, Chukeatirote E, Bahkali AH and Hyde KD. 2011. *Pestalotiopsis*: morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal diversity* 50 (1):167-187. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x>
- Martínez-Camilo R, González-Espinosa M, Pérez-Farrera MA, Quintana-Ascencio PF and Ruiz-Montoya L. 2011. Evaluation of leaf harvesting effect on *Chamaedorea quezalteca* Standl. & Steyerl. (Palmae), in the El Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, México. *Agrociencia* 45(4): 507-518. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30219802009>
- Mayorquin JS, Nouri MT, Peacock BB, Trouillas FP, Douhan GW, Kallsen C and Eskalen A. 2019. Identification, Pathogenicity, and Spore Trapping of *Colletotrichum karstii* Associated with Twig and Shoot Dieback in California. *Plant disease* 103(7):1464-1473. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1425-RE>
- Pacheco-Esteva MC, Soto-Castro D, Vásquez-López A, Lima NB and Tovar-Pedraza JM. 2022. First Report of *Colletotrichum chrysophilum* Causing Papaya Anthracnose in Mexico. *Plant Disease* 106 (12):3213. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-22-0681-PDN>
- Pedroza SA and Samaniego JA. 2009. Análisis del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) en patosistemas agrícolas. Pp:179-189. In: Bautista ME, Soto RL and Pérez PR. 2009. Tópicos selectos de estadística aplicada a la fitosanidad. Primera Edición. Colegio de Posgraduados y IPN- CIIDIR-Oaxaca. 235p.
- Pérez-Farrera MA, Martínez-Camilo R, Martínez-Meléndez N, López-Mendoza S, Espinoza-Medinilla EE, Sánchez-Kramsky S y Ruiz-Castillejos C. 2012. Monitoreo de la palma camedor (*Chamaedorea quezalteca*, Arecaceae) en la reserva de la biosfera La Sepultura, en el Estado de Chiapas, México. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Ciencias Biológicas. Informe Técnico Final, CONANP. Tuxtla Gutiérrez, México. 112 p.
- Raeder U and Broda P. 1989. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1:17-20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Rebollar-Alviter A, Silva-Rojas HV, Fuentes-Aragón D, Acosta-González U, Martínez-Ruiz M and Parra-Robles BE. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease* 104(8):2054-2059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC>
- 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 MA, Ibarra-Rendón, JE and Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3):437-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Saini TJ, Gupta SG, Char BR, Zehr UB and Anandalakshmi R. 2016. First report of chilli anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in India. *New Disease Reports* 34:6. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.034.006>
- Schmidhuber J and Tubiello FN. 2007. Global food security under climate change. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences 104(50):19703–19708. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701976104>
- Shakeel Q, Wu M, Zhang J and Zia-Ul-Haq. 2020. Fungal Diseases of Cat Palm (*Chamaedorea cataractarum*), Bamboo Palm (*Chamaedorea seifrizii*) and Cluster Palm (*Chamaedorea costaricana*). Pp:125-140. In: I. Ul Haq and S. Ijaz (eds), Etiology and Integrated Management of Economically Important Fungal Diseases of Ornamental Palms. Sustainability in Plant and Crop Protection, Vol 16. Springer, Cham. 274p. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-56330-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-56330-1_6)
- Soares VF, Velho AC., Carachenski A, Astolfi P and Stadnik MJ. 2021. First Report of *Colletotrichum karstii* Causing Anthracnose on Strawberry in Brazil. Plant Disease 105 (10): 3295. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0518-PDN>
- Tariq RMS, Shahzad S and Rajput AQ. 2020. Fungal Diseases of Foxtail Palm (*Wodyetia bifurcata*). Pp:115-123. In: I. Ul Haq and S. Ijaz (eds), Etiology and Integrated Management of Economically Important Fungal Diseases of Ornamental Palms. Sustainability in Plant and Crop Protection, Vol 16. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-56330-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-56330-1_5)
- Velho AC, Stadnik MJ, Casanova L, Mondino P and Alaniz S. (2014). First report of *Colletotrichum karstii* causing Glomerella leaf spot on apple in Santa Catarina State, Brazil. Plant Disease 98(1):157-157. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0498-PDN>
- Watanabe T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Second edition. CRC PRESS. Boca Raton, Florida, USA. 486 p.
- White TJ, T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. 482p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

# Morpho-molecular identification of the causal agent of avocado scab in Michoacán

## Identificación morfo-molecular del agente causal de la roña del aguacate en Michoacán

José Luciano Morales-García\*, Claudia Isabel López-Cornejo, Martha Elena Pedraza-Santos, Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas, Edna Esquivel-Miguel, Facultad de Agrobiología Presidente “Juárez”, U.M.S.N.H. P.º Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán, México, C. P. 60170; Soledad García-Morales, Unidad de Biotecnología Vegetal, CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, Zapopan, Jalisco. CP 45019, México; Samuel Pineda-Guillermo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, IIAF. Carretera Morelia Zinapécuaro Kilómetro 9.5, Tarímbaro, Michoacán, México, C. P. 58880.

\*Corresponding autor: jose.morales@umich.mx

Received: February 10, 2023.

Accepted: April 26, 2023.

Morales García JL, López-Cornejo CI, Pedraza-Santos ME, Chávez-Bárceñas AT, Esquivel-Miguel E, García-Morales S and Pineda-Guillermo S. 2023. Morpho-molecular identification of the causal agent of avocado scab in Michoacán. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 182-202.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-4>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

**Abstract.** Mexico is the main producer and exporter of avocado (*Persea americana*) in the world; however, pests and diseases are limiting factors for production. One of the diseases of great economic importance is avocado scab, which is characterized by causing corky-looking lesions on the epicarp of the fruits, which decreases quality

**Resumen.** México es el principal productor y exportador de aguacate (*Persea americana*) en el mundo; sin embargo, las plagas y enfermedades son factores limitantes para la producción. Una de las enfermedades de gran importancia económica es la roña del aguacate, la cual se caracteriza por provocar lesiones de apariencia corchosa en el epicarpio de los frutos, lo que disminuye la calidad y precio hasta en un 60%. En este estudio, se realizó un muestreo dirigido a frutos de aguacate con daño en el epicarpio de aspecto corchoso, estos comúnmente conocidos en campo como “roña” y “mancha púrpura”. Para la identificación molecular y filogenética se utilizó una combinación de técnicas con claves morfológicas y marcadores moleculares (ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, FE-1 $\alpha$ /EF-1 $\alpha$ , Sph1 F/Sph1R). También se realizaron pruebas de patogenicidad en frutos de plantas criollas y de las variedades Hass, Flor de María y Méndez. Mediante el

and price by up to 60%. In this study, a sampling was carried out aimed at avocado fruits with damage in the epicarp with a corky appearance, these commonly known in the field as “scab” and “purple spot”. For molecular and phylogenetic identification, a combination of techniques with morphological keys and molecular markers (ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, FE-1 $\alpha$ /EF-1 $\alpha$ , Sph1 F/Sph1R) was used. Pathogenicity tests were also carried out on fruits in plants of Hass, Flor de María and Méndez varieties. Through morphological analysis, fungi of the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* and *Elsinoe* were identified. Molecular identification and phylogenetic analysis confirmed the presence of the species *Colletotrichum gloeosporioides* and *Elsinoe perseae*. *C. gloeosporioides* reproduced symptoms similar to the avocado scab disease. With the strain identified as *E. perseae*, the symptom known in the field as purple spot was confirmed, while *Pestalotiopsis* sp. caused descending necrosis.

**Keywords:** *Persea americana*, *Elsinoe perseae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, purple spot.

Avocado (*Persea americana*) has an enormous economic importance in Mexico due to the income it produces, making it one of the main agricultural products for export (SIAP, 2022); however, pests and diseases cause important losses in this crop (Urrea and Cardona, 2020). One of the diseases that affects fruit quality is avocado scab, which damages the epicarp of the avocado fruits and manifests itself as corklike lesions (Everett *et al.*, 2011). The layers of corklike tissue are formed as histological defense structures for plants when attacked by a pathogen (Cruz *et al.*, 2006).

*Elsinoe perseae* is the fungus that, since 1934, has been related to the symptomatology caused by avocado scab disease (Everett *et al.*, 2011;

análisis morfológico se identificaron a los hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* y *Elsinoe*. Con la identificación molecular y el análisis filogenético se corroboró la presencia de las especies *Colletotrichum gloeosporioides* y *Elsinoe perseae*. *Colletotrichum gloeosporioides* reprodujo síntomas similares al de la enfermedad roña del aguacate. Con la cepa identificada como *E. perseae* se corroboró el síntoma conocido en campo como “mancha púrpura”, mientras que *Pestalotiopsis* sp. provocó una necrosis descendente.

**Palabras clave:** *Persea americana*, *Elsinoe perseae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, mancha púrpura.

El aguacate (*Persea americana*) es de gran importancia en la economía de México por la captación de divisas, siendo uno de los principales productos agrícolas de exportación (SIAP, 2022); sin embargo, las plagas y enfermedades causan pérdidas importantes en este cultivo (Urrea y Cardona, 2020). Una de las enfermedades que afecta la calidad del fruto es la denominada roña del aguacate, que provoca daños en el epicarpio de los frutos de aguacate manifestándose con lesiones de apariencia corchosa (Everett *et al.*, 2011). Las capas de tejido de apariencia corchosa se forman como estructuras histológicas de defensa de las plantas al ser atacadas por un patógeno (Cruz *et al.*, 2006).

*Elsinoe perseae* es el hongo que desde 1934 se ha relacionado con la sintomatología causada por la enfermedad roña del aguacate (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017); sin embargo, existe una confusión de los daños que provoca este patógeno con los ocasionados por otros factores bióticos (ejemplo; alta incidencia de trips y ácaros) y abióticos (ejemplo; daños mecánicos, daños por rozadura de viento etc.) (SENASICA, 2018).

Fan *et al.*, 2017); however, there is a confusion regarding the damages caused by this pathogen and those caused by other biotic factors such as a high incidence of thrips and mites, and abiotic factors such as mechanical damages, damages caused by wind, etc. (SENASICA, 2018).

Jenkins reported that avocado scab is caused by *E. perseae* and described the symptoms as dark, round or irregular spotty lesions than, when they join, can cover the avocado fruit partially or entirely, giving it a brown, corklike aspect (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017). On the other hand, Morales (2017) described a similar symptom which he called purple spot, or purple spot, which displays round, initially purple lesions that become darker as they grow, and when the coalesce, look like scabs. However, other authors, such as Djeugap *et al.* (2015), Martínez-Hernández *et al.* (2017) and Becerra and Morales (2019), did not associate *E. perseae* to the symptom of the avocado scab, and rather related other pathogens such as *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp. and *Curvularia* sp.

Due to this confusion, the aim of this study was to morphologically and molecularly identify the pathogens related to the avocado scab symptom, taking samples of fruits with a corklike aspect that are commonly known in the field as “typical scab” and “purple spot”. Pathogenicity tests were also carried out to reveal the causal agent of this disease.

## MATERIALS AND METHODS

**Gathering sites.** Avocado fruits with symptoms of corklike aspects, which are commonly known in the field as “typical scab” and “purple spot”, were gathered from different orchard in Michoacán (Figure 1). After gathering, the fruits were placed in brown paper bags (26 x 12.5 x 6.5 cm) to avoid humidity and the development of saprophytic fungi.

Jenkins reportó que la roña del aguacate es causada por *E. perseae* y describió la sintomatología como lesiones de manchas oscuras redondas o irregulares que, al unirse, pueden cubrir parcial o totalmente al fruto de aguacate, dando un aspecto corchoso de color café (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017). Por su parte Morales (2017) describió un síntoma similar al cual denominó mancha púrpura en el cual se presentan lesiones redondas iniciales de color púrpura que, al crecer, adquieren una coloración más oscura y que al coalescer dan el aspecto de roña. Sin embargo, otros autores, como Djeugap *et al.* (2015), Martínez-Hernández *et al.* (2017) y Becerra y Morales (2019), no asociaron a *E. perseae* al síntoma de la roña del aguacate, relacionando a otros patógenos como *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp. y *Curvularia* sp.

Debido a esta confusión, el objetivo de este estudio fue identificar morfológica y molecularmente a los patógenos relacionados con el síntoma de la roña del aguacate, realizando muestreos dirigidos a los frutos de aspecto corchoso que comúnmente en campo son conocidos como “roña típica” y “mancha púrpura”. También se realizaron pruebas de patogenicidad para esclarecer al agente causal de esta enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitios de colecta.** Se colectaron en diferentes huertos de Michoacán frutos de aguacate con síntomas de aspecto corchoso que en campo son conocidos comúnmente como “roña típica” y “mancha púrpura” (Figura 1). Después de la colecta, los frutos se colocaron en bolsas de papel estraza (26 x 12.5 x 6.5 cm) para evitar la humedad y el desarrollo de hongos saprofitos.



Figure 1. Avocado fruits with symptoms known in the field as typical scab (A) and purple spot (B).  
Figura 1. Frutos de aguacate con síntomas conocidos en campo como roña típica (A) y mancha púrpura (B).

To gather the avocado fruits, the agroecological areas were divided according to altitude (meters above sea level, or m.a.s.l.) in which, according to Anguiano *et al.* (2007) three types of climates stand out for the favorable development of this crop and to express its greatest productive potential: humid (1,600 to 1,800 m.a.s.l.), semi-warm subhumid (1,200 to 1,600 m.a.s.l.) and temperate subhumid (1,900 to 2,300 m.a.s.l.) (Table 1).

**Isolation of the fungi.** The avocado fruits gathered from the field were washed with tap water and later rinsed with distilled water to eliminate pollutants. Fresh lesions were taken from the epicarp of the fruit in  $5 \times 5$  mm fragments. For the disinfection of fruits, the method proposed by Zhi Li *et al.* (2008) was used, with slight modifications. The fragments of the epicarp of avocado fruits were placed in a 6% sodium hypochlorite solution for 90 s, then rinsed with sterile distilled water. They were then washed for a second time with 70% ethanol for 60 s, and

Para la colecta de los frutos de aguacate, las áreas agroecológicas se dividieron de acuerdo con la altitud (metros sobre el nivel del mar; m.s.n.m.) que, según Anguiano *et al.* (2007) destacan tres tipos de climas para el desarrollo favorable de este cultivo y expresar su máximo potencial productivo: húmedo (entre 1,600 y 1,800 m.s.n.m.), semicálido subhúmedo (entre 1,200 y 1,600 m.s.n.m.) y templado subhúmedo (entre 1,900 y 2,300 m.s.n.m.) (Cuadro 1).

**Aislamiento de los hongos.** Los frutos de aguacate colectados en campo se lavaron con agua corriente y posteriormente se enjuagaron en agua destilada para eliminar contaminantes. Se tomaron lesiones frescas del epicarpio del fruto en fragmentos de  $5 \times 5$  mm. Para la desinfección de los frutos, se utilizó la metodología propuesta por Zhi Li *et al.* (2008), con algunas modificaciones. Los fragmentos del epicarpio de los frutos de aguacate se colocaron en hipoclorito de sodio al 6% durante 90 s, seguido de

**Table 1. Gathering sites of avocado fruit with symptoms of “typical scab” and “purple spot”.  
 Cuadro 1. Sitios de colecta de frutos de aguacate con síntomas de “roña típica” y “mancha púrpura”.**

| Áreas agroecológicas<br>(m.s.n.m.)          | Sitios de colecta       | Coordenadas              | Altura<br>m.s.n.m |
|---|-------------------------|--------------------------|-------------------|
| Semicálido subhúmedo<br>(1,200 y 1,600)     | Cerro colorado          | 19°31'69"N, 100°46'58"O  | 1,243             |
|   | Ordeñitas               | 19°23'50"N, 102°18'94"O  | 1,060             |
|   | Patuan                  | 19°39'16"N, 101°91'50"O  | 1,260             |
|   | Zumpimíto               | 19°37'29"N, 100°55'4"O   | 1,600             |
|   | Ziracuaretiro           | 19°43'57"N, 101°92'93"O  | 1,380             |
|   | Taretan                 | 19°33'38"N, 101°918'33"O | 1,130             |
|   | Mesa de Cazares         | 19°37'75"N, 101°85'39"O  | 1,560             |
|   | San Ángel Zurumucapio   | 19°44'77"N, 101°88'86"O  | 1,600             |
|   | Pareo                   | 19°33'13"N, 102°45'08"O  | 1,430             |
|   | Jicalan                 | 19°38'33"N, 102°07'61"O  | 1,600             |
| Húmedo (entre 1,600 y<br>1,800)             | Zacandaro               | 19°35'94"N, 102°18'58"O  | 1,700             |
|   | Cutzato                 | 19°36'63"N, 102°13'47"O  | 1,700             |
|   | Toreo el alto           | 19°46'00"N, 102°00'30"O  | 1,800             |
|   | La Basilia              | 19°46'25"N, 102°06'50"O  | 1,860             |
|   | San Andrés Coru         | 19°46'75"N, 101°94'50"O  | 1,700             |
|   | San Juan Nuevo          | 19°41'66"N, 102°12'86"O  | 1,880             |
| Templado subhúmedo<br>(entre 1,900 y 2,300) | Ario de Rosales         | 19°20'72" N, 101°70'80"O | 1,910             |
|   | Canacuas                | 19°64'38" N, 102°04'83"O | 2,200             |
|   | Tingambato              | 19°50'19" N, 101°85'25"O | 1,980             |
|   | Zirahuen                | 19°54'167"N, 101°73'19"O | 2,090             |
|   | Tancitaro               | 19°33'75"N, 102°36'30"O  | 2,080             |
|   | El Durazno              | 19°08'25"N, 101°66'00"O  | 1,900             |
|   | Lagunillas              | 19°56'25"N, 101°41'58"O  | 2,100             |
|   | Cheran                  | 19°68'66"N, 101°95'47"O  | 2,380             |
| Salvador Escalante                          | 19°40'64"N, 101°64'00"O | 2,239                    |                   |

rinsed for the last time with sterile distilled water. The tissue was placed in sterilized paper towels to absorb humidity. Once the fragments of the plant material were disinfected, they were planted equidistantly in Petri dishes with a PDA culture medium, then the dishes were sealed with parafilm, incubated at 28 °C with a humidity of 80% for 72 h. After this time, the Petri dishes were inspected for fungal growth.

**Morphological identification.** To identify the fungal isolations, the taxonomical keys by Barnett and Hunter (2006) were used. To identify *E.*

un enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente, se realizó un segundo lavado con etanol al 70% durante 60 s y un último enjuague con agua destilada estéril. El tejido se colocó en toallas de papel esterilizadas para absorber la humedad. Una vez que los fragmentos del material vegetal se desinfectaron, se realizó la siembra en cajas Petri con medio de cultivo PDA, de manera equidistante, las cajas se sellaron con parafilm, se incubaron a 28 °C, con 80% de humedad, durante 72 h. Después de este tiempo, las cajas Petri se revisaron para observar el crecimiento de los hongos.



*perseae*, the strain ATCC 11190 of this species was taken as a reference, which is found in the microbial collection in Miami, Florida, U.S.A. and which was provided by the Technology and Design Research and Assistance Center for the State of Jalisco (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. - CIATEJ), Zapopan, Jalisco, Mexico.

**Molecular identification.** The purified isolations taken from the fungus were taken to the CIATEJ for the extraction of DNA by breaking the cell wall and membrane. The buffer solution was CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) to promote cell lysis. Chloroform-isoamyl alcohol was used (in a 24:1 ratio) as an organic solvent and centrifuged at 5,000 rpm for 10 min to promote the denaturation and separation of proteins. The DNA was then precipitated and its quality was verified by electrophoresis in a 1.0% agarose gel.

The concentration of the genomic DNA was quantified with a Nanodrop and it was adjusted to 20 ng mL<sup>-1</sup>. DNA amplification was carried out with a PCR, using primers ITS-5/ITS-4, ITS1/ITS4, EF-1 $\alpha$  F/ EF-1 $\alpha$  R and Sph1F/Sph1R. The amplifications of the PCR products were verified by electrophoresis with a 5 $\mu$ L gel sample in a 1.5% agarose gel. The PCR products were purified following the instructions by the manufacturer (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega<sup>®</sup>). The amplified fragments were sent to the Macrogen lab (Seoul, South Korea) for sequencing.

The bidirectional sequences were aligned with the Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) and MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013) programs, they were verified in BioEdit (Hall, 1999) in order to obtain a consensus sequence and the sequence obtained was assembled and compared with those available in the National

**Identificación morfológica.** Para la identificación de los aislamientos de los hongos se utilizaron las claves de Barnett y Hunter (2006). Para identificar a *E. perseae* se tomó como referencia la cepa ATCC 11190 de esta especie, la cual se encuentra depositada en el cepario de Miami, Florida, EUA y que fue facilitada por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Zapopan, Jalisco, México.

**Identificación molecular.** Los aislamientos purificados del hongo se trasladaron al CIATEJ para la extracción de ADN mediante la ruptura de la pared y membrana celular. La solución amortiguadora fue CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) para favorecer la lisis celular. Se utilizó cloroformo-alcohol isoamílico (en proporción 24:1) como disolvente orgánico y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min para favorecer la desnaturalización y separación de proteínas. Se procedió con la precipitación del ADN y se verificó su calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 %.

La concentración del ADN genómico se cuantificó con un Nanodrop y se ajustó a 20 ng mL<sup>-1</sup>. La amplificación del ADN se realizó mediante PCR, usando los iniciadores ITS-5/ITS-4, ITS1/ITS4, EF-1 $\alpha$  F/ EF-1 $\alpha$  R y Sph1F/Sph1R. Las amplificaciones de los productos de la PCR se verificaron por electroforesis con 5 $\mu$ L de muestra en un gel de agarosa al 1.5 %. La purificación de los productos de PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega<sup>®</sup>). Los fragmentos amplificados se enviaron al laboratorio de Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación.

Las secuencias bidireccionales se alinearon con los programas Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) y MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013), se corroboraron en BioEdit (Hall, 1999) con la finalidad de obtener una secuencia consenso y la

Center for Biotechnological Information (NCBI), using the BLAST tool for highly similar sequences. For the identification with BLASTn, the percentage of coverage and similarity was considered; values of  $\geq 80\%$  of coverage and a range of 97 to 100% of similarity of the sequence was considered, that is, a divergence of up to 3% of the sequence to assign a species (Raja and Oberlies, 2017).

**Phylogenetic analysis.** A multilocus phylogenetic analysis was carried out for the isolations identified as *E. perseae*, using the sequences obtained with the primers ITS5/ITS4 or ITS1/ITS4, SPh1 F/SPh1 R (LSU) and EF-1 $\alpha$  F/ EF-1 $\alpha$  R. For this analysis, sequences from species of the genus *Elsinoe*, previously deposited in the GenBank® data base were used. In the case of the isolations obtained from “typical scab”, an analysis was carried out based on the sequencing of primers ITS4/ITS5.

Once the consensus sequences were obtained, they were compiled in a FASTA format. Later, the sequences were aligned using the MAFFT v.7.475 program (Kato and Standley, 2013). The sequences from LSU, EF-1 $\alpha$  and ITS, obtained from strains identified as *E. perseae* were linked in the MESQUITE v.3.6 program (Maddison and Maddison, 2016). The phylogenetic analysis was based on the Bayesian inference (BI) algorithm and previously, the evolutionary model was determined using the JModeltest 2.1.7 program (Nylander, 2004).

For the phylogenetic analysis of the strains identified as *Colletotrichum gloeosporioides*, the sequence obtained with primers ITS5/ITS4 was used, as well as sequences from homologous species and others belonging to the same genus obtained from the GenBank. For the location of the isolations, the program MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) was used, with a Jukes Cantor (JC) evolutionary model obtained in the program

secuencia obtenida se ensambló y comparó con las disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), usando la herramienta BLAST para secuencias altamente similares.

Para la identificación con BLASTn se consideró el porcentaje de cobertura y similitud, se consideraron valores  $\geq 80\%$  de cobertura y un rango de 97 a 100 % de similitud de la secuencia. Es decir, hasta 3% de divergencia de la secuencia para asignar una especie (Raja y Oberlies, 2017).

**Análisis filogenético.** Se realizó un análisis filogenético multilocus para los aislamientos identificados como *E. perseae*, utilizando las secuencias obtenidas con los iniciadores ITS5/ITS4 o ITS1/ITS4, SPh1 F/SPh1 R (LSU) y EF-1 $\alpha$  F/ EF-1 $\alpha$  R. Para este análisis se utilizaron secuencias de especies del género *Elsinoe* ya depositadas en la base de datos del GenBank®. En el caso de los aislamientos obtenidos de “roña típica” se realizó un análisis basado en la secuenciación de los iniciadores ITS4/ITS5.

Una vez obtenidas las secuencias consenso, éstas se compilaron en formato FASTA. Después, las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v.7.475 (Kato y Standley, 2013). Las secuencias de los genes LSU, EF-1 $\alpha$  e ITS obtenidas de las cepas identificadas como *E. perseae* se concatenaron en el programa MESQUITE v.3.6 (Maddison y Maddison, 2016). El análisis filogenético se basó en el algoritmo de inferencia bayesiana (BI) y previamente se determinó el modelo evolutivo en el programa JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004).

Para el análisis filogenético de las cepas identificadas como *Colletotrichum gloeosporioides* se utilizó la secuencia obtenida con los iniciadores ITS5/ITS4, así como secuencias de especies homólogas y otras pertenecientes al mismo género obtenidas del GenBank. Para la ubicación de los aislamien-

JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). Ten thousand generations were considered and samples were taken from trees every 1,000 repetitions. It was executed under the Markov Monte Carlo (MCMC) model and the analysis stopped once an average was obtained, along with the frequency partition standard deviation (se) between chains, below 0.01 (se = 0.0099). Twenty-two phylogenetic trees were obtained, out of which 18 were sampled, and 25% of the trees were discarded. The remaining phylogenetic trees were combined to calculate the posterior probability and obtain a consensus tree (Holder and Lewis, 2003). *C. boninense*, strain 126 was used as an external group to the species, since it belongs to another complex of the same genus.

A multilocus phylogenetic analysis was carried out for the species *E. perseae* in order to provide greater reliability and support to the identification of the isolations of this fungus. The sequences obtained in this investigation were considered, along with homologous sequences and those from other species of the same genus that cause similar damages to other plant species. The fungus *Myriangium hispanicum*, which belongs to the family Myringiaceae, was used as an external group. The sequences were obtained from the GenBank database, according to Fan *et al.* (2017). Once the sequences were obtained, a FASTA file was created. The sequences were aligned with the program MAFFT v.7.475 (Katoh and Standley, 2013) for each gene. The genes were linked with the program Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) and MESQUITE v.3.6 (Maddison and Maddison, 2016). The evolutionary model was obtained using the software JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). The phylogenetic analysis was carried out using the BI algorithm with the program MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). A total of 575,000 generations were considered and tree samples were taken every 1,000 repetitions. It was

se utilizó el programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) con un modelo evolutivo Jukes Cantor (JC) obtenido en el programa JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). Se consideraron 10,000 generaciones y se tomaron muestras de árboles cada 1,000 repeticiones. Se ejecutó bajo el modelo Markov Monte Carlo (MCMC) y el análisis se detuvo una vez que se obtuvo un promedio y la desviación estándar (se) de partición de frecuencias entre cadenas, menor a 0.01 (se = 0.0099). Se obtuvieron 22 árboles filogenéticos de los cuales se muestrearon 18, se descartó el 25 % de los árboles. El resto de los árboles filogenéticos se combinaron para calcular la probabilidad posterior y obtener un árbol consenso (Holder y Lewis, 2003). Se utilizó como grupo externo a la especie *C. boninense*, cepa 126, perteneciente a otro complejo del mismo género.

Para la especie *E. perseae* se realizó un análisis filogenético multilocus para aportar mayor confiabilidad y soporte a la identificación de los aislados de este hongo. Se consideraron las secuencias obtenidas en esta investigación, las secuencias homólogas y de otras especies del mismo género que ocasionan daños similares en otras especies de plantas. Como grupo externo se utilizó al hongo *Myriangium hispanicum* que pertenece a la familia Myringiaceae. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del GenBank, según Fan *et al.* (2017). Una vez obtenidas las secuencias, se creó un archivo en formato FASTA. Las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013) para cada gen. La concatenación de los genes se realizó con el programa Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) y MESQUITE v.3.6 (Maddison y Maddison, 2016). El modelo evolutivo se obtuvo con el software JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). El análisis filogenético se realizó mediante el algoritmo de IB con el programa MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). Se consideraron 575,000 generaciones y se tomaron muestras

executed under the MCMC model and the analysis stopped once an average and a standard deviation of frequency partition between chains below 0.01 ( $de = 0.0097$ ) were obtained. A total of 1,152 phylogenetic trees were obtained, out of which 864 were sampled; 25% of the trees sampled were discarded. The rest of the trees were combined to calculate the posterior probability and obtain a consensus tree (Holder and Lewis, 2003).

**Pathogenicity tests.** In order to evaluate pathogenicity, 25 avocado plants from nurseries were used (creole, Hass, Flor de María, Méndez), approximately 18 months after being transplanted. The avocado fruits were inoculated when their size was 6-9 cm in length by 4-6 cm in width (stage of the filling of the fruit). The isolations selected for pathogenicity tests were those that had a higher percentage of growth of every symptom sampled. Leaves, branches and fruits from each plant of every variety were inoculated.

Two types of inoculation were carried out: direct and indirect. The former consisted in cutting a lesion in the epicarp of the fruit and in the young stems with a number 0 entomological pin. Mycelium discs were then placed ( $\approx 1$  cm in diameter) in the isolated fungi on the lesion, and covered with cotton dampened with sterile distilled water and “kleen pack” plastic. The indirect method consisted of performing small lesions on the fruits and young branches, followed by the spraying of a suspension with conidia, spores and fragments of mycelia at a concentration of  $1 \times 10^6$  propagules  $\text{mL}^{-1}$ , prepared following Gilchrist Saavedra *et al.* (2005). Finally, the plants were covered with a plastic bag, as if in a humid chamber, for three days. The incidence of the symptom was evaluated in the different varieties.

The inoculated fruits were observed weekly for three months to detect the presence of the symptoms. Next, the fungi were reisolated to verify the identity of the pathogen.

de árboles cada 1,000 repeticiones. Se ejecutó bajo el modelo MCMC y el análisis se detuvo una vez que se obtuvo un promedio y desviación estándar de partición de frecuencias entre cadenas menor a 0.01 ( $de = 0.0097$ ). Se obtuvieron 1,152 árboles filogenéticos de los cuales se muestrearon 864, se descartó el 25 % de los árboles muestreados. El resto de los árboles se combinaron para calcular la probabilidad posterior y obtener un árbol consenso (Holder y Lewis, 2003).

**Pruebas de patogenicidad.** Para evaluar la patogenicidad, se utilizaron 25 plantas de aguacate (criollo, Hass, Flor de María, Méndez) de vivero de aproximadamente 18 meses de haber sido injertadas. Los frutos de aguacate se inocularon cuando tenían un tamaño de 6-9 cm de largo por 4-6 cm de ancho (etapa de llenado de fruto). Los aislamientos seleccionados para las pruebas de patogenicidad fueron las que tuvieron un porcentaje mayor de crecimiento de cada síntoma muestreado. Se inocularon hojas, ramas y frutos de cada planta de cada variedad.

Se realizaron dos tipos de inoculación: directa e indirecta. La primera consistió en realizar heridas en el epicarpio del fruto y en los tallos jóvenes con un alfiler entomológico del número 0. Posteriormente, se colocaron discos ( $\approx 1$  cm de diámetro) de micelio de los hongos aislados sobre la herida, y se cubrió con algodón húmedo con agua destilada estéril y plástico “kleen pack”. En el método indirecto se realizaron pequeñas heridas a los frutos y a las ramas jóvenes, después se asperjó una suspensión con conidios, esporas y fragmentos de micelio a una concentración de  $1 \times 10^6$  propágulos  $\text{mL}^{-1}$  que se preparó según Gilchrist Saavedra *et al.* (2005). Finalmente, las plantas se cubrieron con una bolsa de plástico a manera de cámara húmeda durante tres días. En las diferentes variedades se evaluó la incidencia del síntoma.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Morphological identification.** Out of the plant tissues planted with symptoms of “typical scab”, 16 different isolations were obtained, eight of which were identified as possible phytopathogenic fungi, which correspond to the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* and *Epicoccum*. Out of these, the genus *Colletotrichum* was the most frequent (90%), followed by *Pestalotiopsis* (40%). The rest of the fungi did not surpass 3%. These data coincide with works by Djeugap *et al.* (2015), Alfaro *et al.* (2017) and Becerra (2019), who reported the presence of species of the genus *Colletotrichum* more frequently in isolations of the avocado scab symptom.

Based on the studies carried out by Hernández and González (2010) and Pérez *et al.* (2016), the remaining eight species were discarded due to their lower frequency of culture development (presence in a maximum of three dishes planted), as well as to the identification as pollutant fungi, for the case of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*.

In the morphological identification of the strain with the highest growth frequency, the development of white cultures with a gray center and a cottonlike texture was observed, with a production of orange conidial masses in the center. This culture was characterized for its rapid growth (it covered the 15 cm Petri dish in 8 days). In its microscopic characteristics, it displayed a septated mycelium, unicellular conidia elongated to the point of being almost cylindrical, with a slight narrowing in the center, giving it an appearance similar to a septum, and with rounded edges (Barnett and Hunter, 1998). These characteristics coincide with those described for the genus *Colletotrichum*, belonging to the phylum Ascomycota, class Hypocreomycetidae

Los frutos inoculados se observaron cada semana, durante tres meses para detectar la presencia de los síntomas. Después se realizaron reaislamientos de los hongos para corroborar la identidad del patógeno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación morfológica.** De la siembra del tejido vegetal con síntoma de “roña típica” se obtuvieron 16 aislamientos diferentes, ocho se identificaron como posibles hongos fitopatógenos, los cuales corresponden a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* y *Epicoccum*. De éstos, el género *Colletotrichum* fue el más frecuente observándose su crecimiento en el 90% de las cajas, seguido de *Pestalotiopsis* en 40% de estas y el resto de los hongos no superó el 3%. Estos datos concuerdan con los trabajos de Djeugap *et al.* (2015), Alfaro *et al.* (2017) y Becerra (2019), quienes reportaron la presencia de especies del género *Colletotrichum* con mayor frecuencia en aislamientos del síntoma de la roña del aguacate.

Con base en los estudios realizados por Hernández y González (2010) y Pérez *et al.* (2016), se descartaron las ocho especies restantes por su menor frecuencia de desarrollo de colonias (presencia en un máximo en tres cajas sembradas), así como por la identificación como hongos contaminantes para el caso de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*.

En la identificación morfológica de la cepa con mayor frecuencia de crecimiento, se observó el desarrollo de colonias blancas con el centro gris, de textura algodonosa, con producción de masas conidiales de color naranja en el centro. Se caracterizó por ser una colonia de rápido crecimiento (en ocho días cubrió la caja Petri de 15 cm de diámetro).

and order Glomerellales (Réblová *et al.*, 2011) (Figure 2).

The second isolation with the highest growth percentage, *Pestalotiopsis* sp., developed white septated mycelium cultures with a brush-shaped growth. In addition, the development of black fructiferous bodies that presented multicellular spindle-shaped conidia (3 to 5 cells) with three apical flagella and one basal one (Barnett and Hunter, 2006). These characteristics coincided with those described for the genus that belongs to the phylum Ascomycota, class Sordariomycetes and order Xylariales (Réblová *et al.*, 2011) (Figure 2).

En sus características microscópicas, se observó micelio septado, conidios unicelulares alargados, casi cilíndricos con un ligero estrechamiento en el centro que da la apariencia de un septo y con extremos redondeados (Barnett y Hunter, 1998). Estas características coinciden con las referidas para el género *Colletotrichum* perteneciente al Phylum Ascomycota, Clase Hypocreomycetidae y Orden Glomerellales (Réblová *et al.*, 2011) (Figura 2).

El segundo aislamiento con mayor porcentaje de crecimiento, *Pestalotiopsis* sp., desarrolló colonias blancas de micelio septado con un crecimiento rosetado. Además, se observó el desarrollo de

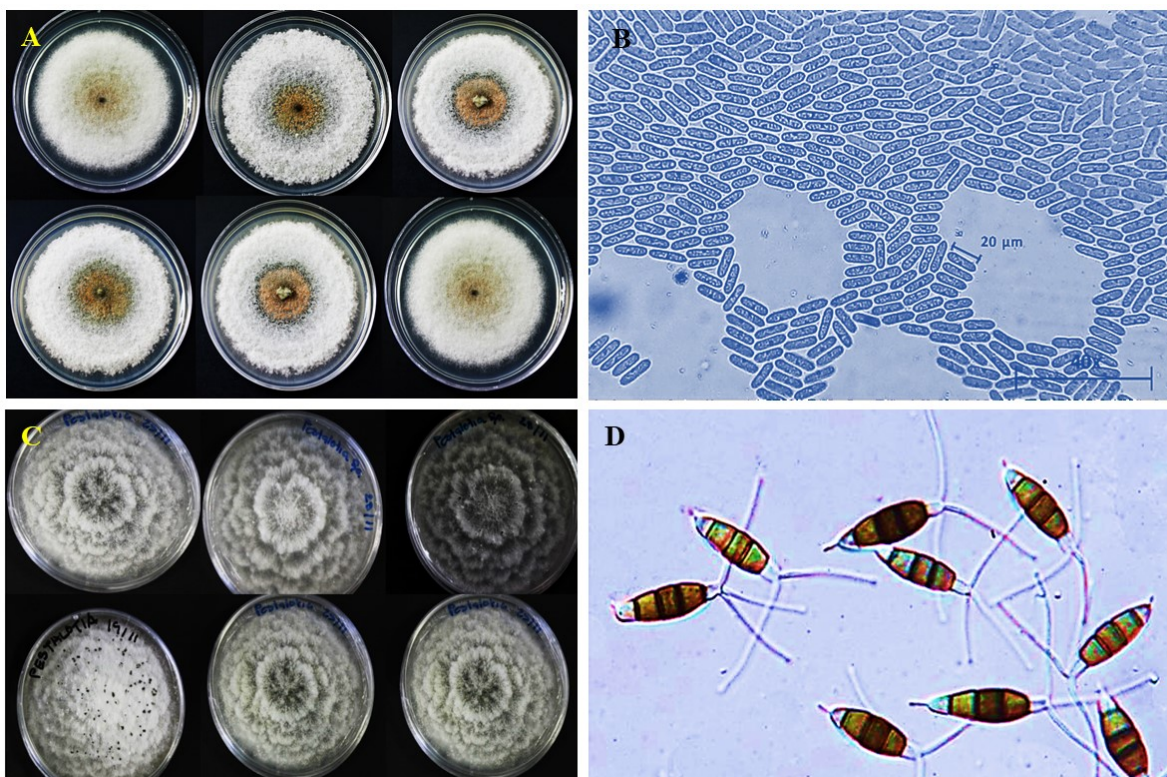


Figure 2. A) Isolations of the genus *Colletotrichum* sp. that show the cottonlike growth with a high content of formation of orange to pink waxy propagules in the center. B) Formation of hyaline, ovoidal or oblong conidia, with a shortened shape and an even, 25- 30 µm, circular ending. C) *Pestalotiopsis* sp. cultures and a development of bright black and irregularly shaped cirrus. d) Conidia with septa and three flagella.

Figura 2. A) Aislamientos del género *Colletotrichum* sp. que muestran el crecimiento algodonoso con alto contenido de formación en el centro de propágulos cerosos de color naranja a rosado. B) Formación de conidios hialinos, ovoides u oblongos de forma acortada con terminación circular uniforme de 25- 30 µm. C) Colonias de *Pestalotiopsis* sp. y desarrollo de cirrus color negro brillante y de forma irregular. d) Conidios con septos y tres flagelos.

**“Purple spot” symptom.** In the plant tissue with symptoms of “purple spot”, the cultures that were obtained most frequently were those that grew in viscous and cerebriform stroma, with a slow growth of 0.35 mm per day, elevations in the center, a great variability of shapes and light orange and light yellow colors, which became darker with age, turning reddish browns, some of which were plushy-looking, with aerial mycelia and humid in the center, with micro and macro conidia from 3 to 14 microns and tuberculate mycelium; these were identified morphologically as *Elsinoe* sp., since these characteristics coincide with those presented by Hyde *et al.* (2013) as characteristics of the genus *Elsinoe*. *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. were also identified with occasional growth (1-2%) (Figure 3).

cuerpos fructíferos de color negro que presentaron conidios multicelulares fusiformes (de 3 a 5 células) con tres flagelos apicales y uno basal (Barnett y Hunter, 2006). Estas características coincidieron con las referidas para este género que pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes y Orden Xylariales (Réblová *et al.*, 2011) (Figura 2).

**Síntoma de “mancha púrpura.”** Del tejido vegetal con síntoma de “mancha púrpura”, se obtuvieron 25 aislamientos, en los cuales las colonias con mayor frecuencia fueron las de crecimiento en estroma tipo viscoso y cerebriforme, lento crecimiento de 0.35 mm por día, con elevaciones en el centro, con gran variabilidad de formas y colores naranjas claro, amarillo claro, que con la edad se oscurecieron tornándose rojos cafés rojizos, algunas de

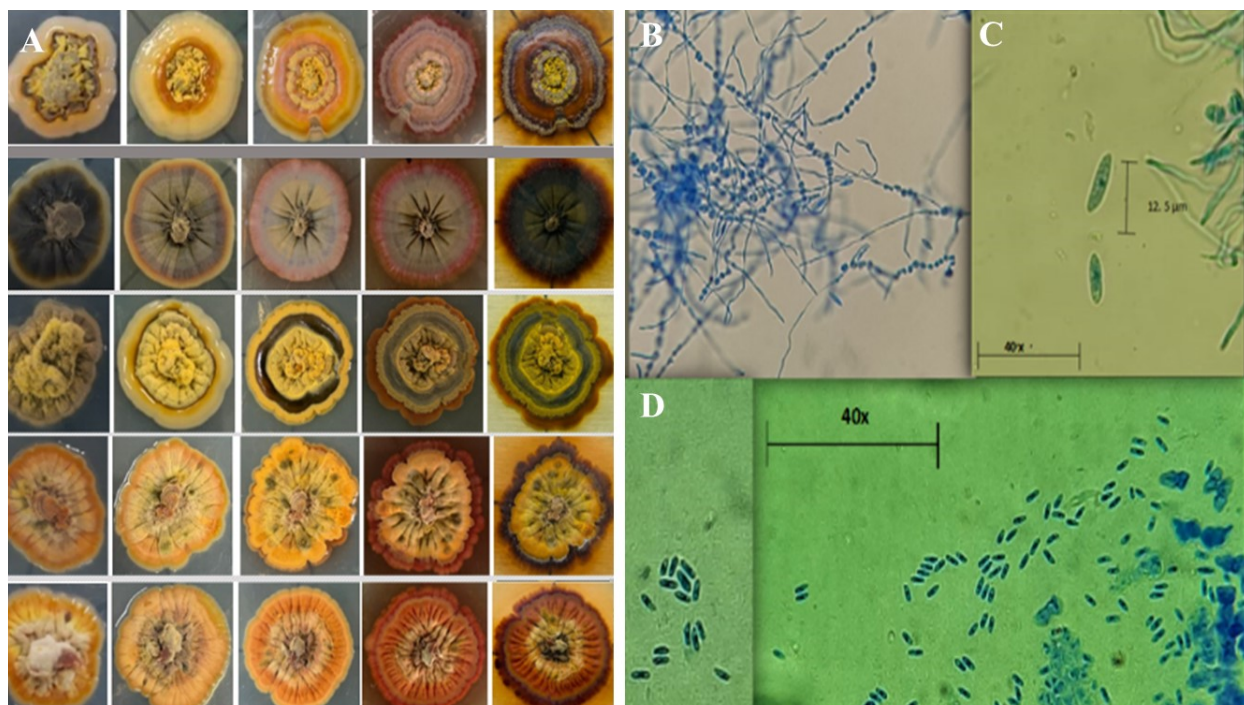


Figure 3. A) Variability in color and shape of the growth of *E. perseae* isolations. B) tuberculate mycelium. C) and D) conidia measuring 3-14 micrometers.

Figura 3. A) Variabilidad en color y forma de crecimiento de los aislados de *E. perseae*. B) micelio turuloso. C) y D) conidios de 3-14 micrometros.

**Molecular identification.** With the amplification of primers ITS5/ITS4, *C. gloeosporioides* was identified; however, for *Pestalotiopsis* sp., the sequencing results were not conclusive (Table 2). On the other hand, the sequencing of genes LSU, EF-1 $\alpha$  and ITS helped identify *E. perseae* (Table 3). The nucleotide sequences identified were deposited in the GenBank data base (Table 4).

apariciencia afelpada, micelio aéreo y humedad en el centro, con presencia de micro y macro conidios que fueron de los 3-14 micras y micelio turuloso, estas fueron identificadas morfológicamente como *Elsinoe* sp., ya que estas características concuerdan con lo expuesto por Hyde *et al.* (2013), como características del género *Elsinoe*. También se identificó con crecimientos esporádicos (1-2%) a *Colletotrichum* sp. y *Alternaria* sp. (Figura 3).

**Table 2. Molecular identification of the strains isolated from the symptom of “typical scab” by the amplification of primers ITS5/ITS4.**

**Cuadro 2. Identificación molecular de las cepas aisladas del síntoma de “roña típica” mediante la amplificación de los iniciadores ITS5/ITS4.**

| Aislamiento | Identificación morfológica | Secuencia homóloga del Gene Bank | Especie                   | Identidad (%) |
|-------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------|
| C7          | <i>Colletotrichum</i> sp.  | MK758005.1                       | <i>C. gloeosporioides</i> | 100           |
| C9          | <i>Pestalotiopsis</i> sp.  | N/A                              | N/A                       | N/A           |

**Table 3. Molecular identification of the fungus isolated from the symptom of “purple spot” by sequencing the genes LSU, EF-1 $\alpha$  and ITS.**

**Cuadro 3. Identificación molecular del hongo aislado del síntoma de “mancha púrpura” mediante la secuencia de los genes LSU, EF-1 $\alpha$  e ITS.**

| Aislamiento | Identificación morfológica | Secuencia homóloga del GenBank® | Especie           | Identidad (%) |
|-------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------|
|             |                            | ITS                             |                   |               |
| C1          | <i>E. perseae</i>          | MH855586.1                      | N/A               | N/A           |
| C4          | <i>E. perseae</i>          | MH855586.1                      | <i>E. perseae</i> | 99.69         |
| H3          | <i>E. perseae</i>          | MH855586.1                      | <i>E. perseae</i> | 99.67         |
| H4          | <i>E. perseae</i>          | MH855586.1                      | <i>E. perseae</i> | 99.51         |
| H6          | <i>E. perseae</i>          | MH855586.1                      | <i>E. perseae</i> | 97.46         |
|             |                            | EF-1 $\alpha$                   |                   |               |
| C1          | <i>E. perseae</i>          | KX886902.1                      | <i>E. perseae</i> | 100           |
| C4          | <i>E. perseae</i>          | KX886902.1                      | <i>E. perseae</i> | 99.71         |
| H3          | <i>E. perseae</i>          | KX886902.1                      | <i>E. perseae</i> | 100           |
| H4          | <i>E. perseae</i>          | KX886902.1                      | <i>E. perseae</i> | 100           |
| H6          | <i>E. perseae</i>          | KX886902.1                      | <i>E. perseae</i> | 100           |
|             |                            | LSU                             |                   |               |
| C1          | <i>E. perseae</i>          | NG_063977.1                     | <i>E. perseae</i> | 99.72         |
| C4          | <i>E. perseae</i>          | NG_063977.1                     | <i>E. perseae</i> | 99.86         |
| H3          | <i>E. perseae</i>          | NG_063977.1                     | <i>E. perseae</i> | 99.17         |
| H4          | <i>E. perseae</i>          | NG_063977.1                     | <i>E. perseae</i> | 99.72         |
| H6          | <i>E. perseae</i>          | NG_063977.1                     | <i>E. perseae</i> | 99.86         |



**Table 4. Sequences selected for the phylogenetic analysis of *E. perseae*.**  
**Cuadro 4. Secuencias seleccionadas para el análisis filogenético de *E. perseae*.**

| Especie                   | Código del aislamiento | Número de acceso al Genbank |          |               |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------|----------|---------------|
|                           |                        | ITS                         | LSU      | EF-1 $\alpha$ |
| <i>C. gloeosporioides</i> | C7                     | MZ314618                    |          |               |
| <i>E. perseae</i>         | C1                     | N/A                         | MZ310447 | MZ319391      |
| <i>E. perseae</i>         | C4                     | MZ310437                    | MZ310448 | MZ319392      |
| <i>E. perseae</i>         | H3                     | MZ310438                    | MZ310449 | MZ319393      |
| <i>E. perseae</i>         | H4                     | MZ310439                    | MZ310450 | MZ319394      |
| <i>E. perseae</i>         | H6                     | MZ310440                    | MZ310451 | MZ319395      |

**Phylogenetic analysis of the isolations obtained from avocado fruits with symptoms of “typical scab”.** The phylogenetic tree grouped six clades, along with the external group, out of which two group the entire species of *C. gloeosporioides*, in which the strain identified in this study is found. This verifies the identity of the isolations obtained in this study as *C. gloeosporioides* (Figure 4).

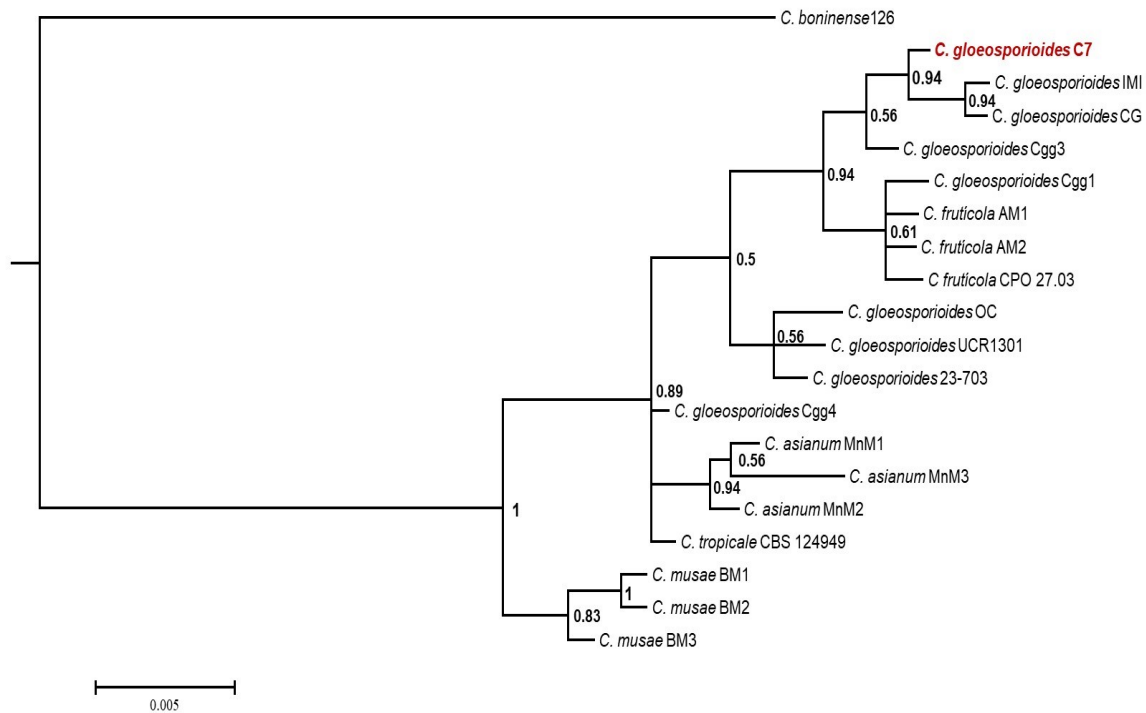
**Phylogenetic analysis of the strains isolated from avocado fruits with symptoms of “purple spot”.** The Bayesian phylogenetic tree grouped more than 14 clades, along with the external group. The sequences obtained from the strains morphologically identified as *E. perseae* were grouped with the strains deposited in the GenBank with the same species, which corroborates the identity of the strains isolated from the “purple spot symptom” as *E. perseae* and it supports the monophyletic origin of this species (Figure 5).

**Pathogenicity tests.** It was inoculated with *Pestalotiopsis* sp. and *C. gloeosporioides* to evaluate the “typical scab” symptom; and with an isolation identified as *E. perseae* to evaluate the “purple spot” symptom.

**Identificación molecular.** Mediante la amplificación de los iniciadores ITS5/ITS4 se identificó a *C. gloeosporioides*; sin embargo, para *Pestalotiopsis* sp. los resultados de la secuenciación no fueron concluyentes (Cuadro 2). Por otro lado, mediante la secuencia de los genes LSU, EF-1 $\alpha$  e ITS se identificó a *E. perseae* (Cuadro 3). Las secuencias de nucleótidos identificadas se depositaron en la base de datos del GenBank (Cuadro 4).

**Análisis filogenético de los aislamientos obtenidos de frutos de aguacate con síntomas de “roña típica”.** El árbol filogenético agrupó seis clados, además del grupo externo, de los cuales dos agrupan en su totalidad a la especie *C. gloeosporioides*, donde se encuentra la cepa identificada en el presente estudio. Esto corrobora la identidad de los aislamientos obtenidos en el presente estudio como *C. gloeosporioides* (Figura 4).

**Análisis filogenético de las cepas aisladas de frutos de aguacate con síntoma de “mancha púrpura”.** El árbol filogenético bayesiano agrupó a más de 14 clados, además del grupo externo. Las secuencias obtenidas de las cepas identificadas morfológicamente como *E. perseae* se agruparon con las cepas depositadas en el GenBank con la misma



**Figure 4.** Bayesian phylogenetic tree for the complex *Colletotrichum gloeosporioides*, reconstructed using primers ITS5/ITS4. Red text is the isolation obtained in this work. The bar indicates substitution per site. Nodes exemplify the posterior probability (PP). *C. boninense*, isolation 126, which belongs to another complex of the genus, was used as an external group.

**Figura 4.** Árbol filogenético bayesiano para el complejo *Colletotrichum gloeosporioides*, reconstruido utilizando los iniciadores ITS5/ITS4. En color rojo se muestra el aislamiento obtenido en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo *C. boninense*, aislamiento 126, perteneciente a otro complejo del género.

***Pestalotiopsis* sp.** The symptom caused by the fungus identified as *Pestalotiopsis* sp. was dry necrosis, which moves up the stem until the base of the branch and caused the mummification of the fruits in plants of the varieties Hass and Flor de María. The least severe symptoms were found in creole plants and the variety Flor de María, causing a partial necrosis with vertical cracks; these symptoms coincide with reports by Tamayo (2007), such as the drying of branches and leaf spots.

Authors such as Morales *et al.* (2009) have isolated *Pestalotiopsis versicolor* from avocado

especie, lo que corrobora la identidad de las cepas aisladas del síntoma de “mancha púrpura” como *E. perseae* y soporta el origen monofilético de esta especie (Figura 5).

**Pruebas de patogenicidad.** Se inoculó con *Pestalotiopsis* sp. y *C. gloeosporioides* para evaluar el síntoma de “roña típica”; y con aislamiento identificado como *E. perseae* para evaluar el síntoma de “mancha púrpura”.

***Pestalotiopsis* sp.** El síntoma que ocasionó el hongo identificado como *Pestalotiopsis* sp., fue necrosis seca

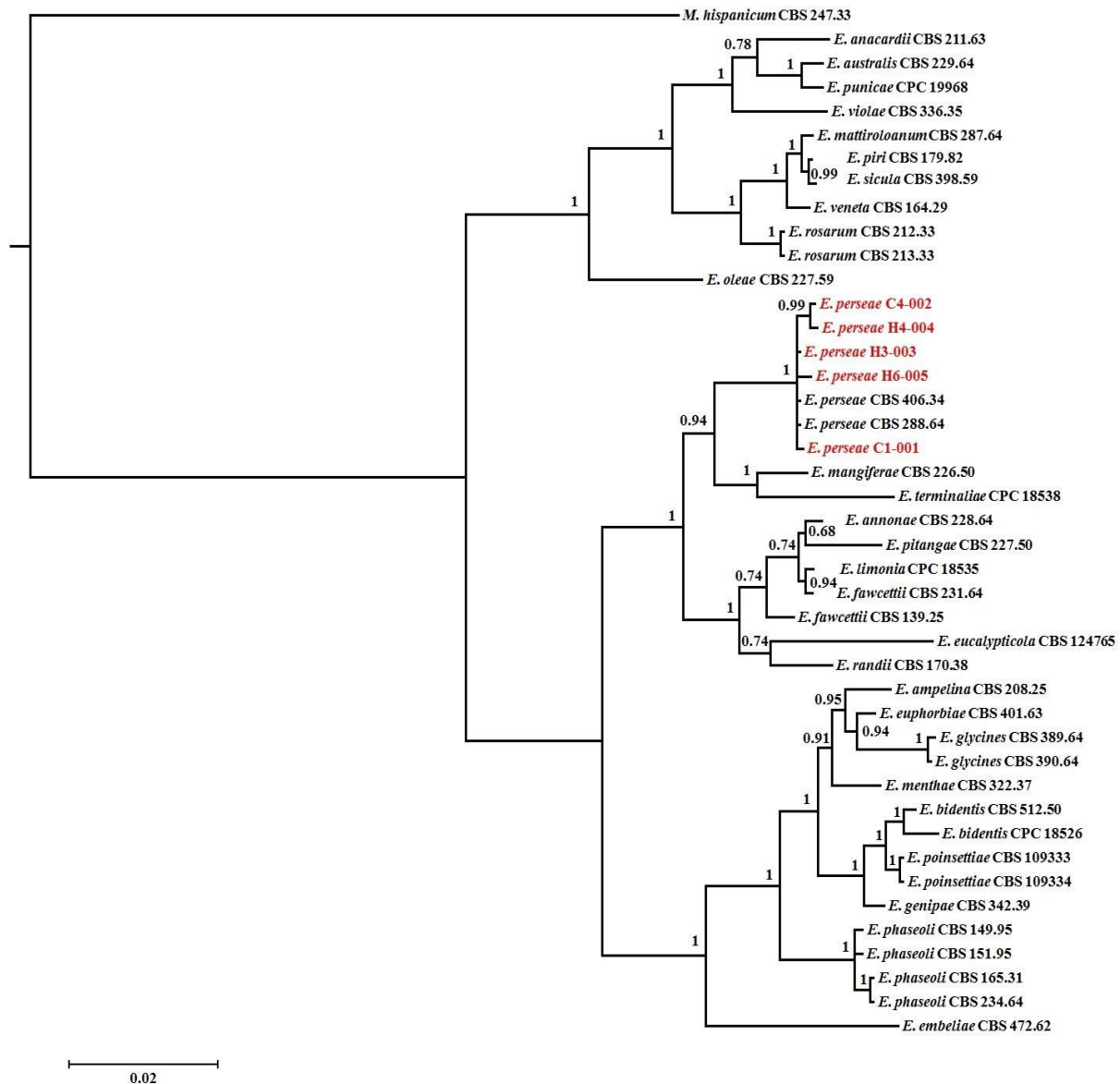


Figure 5. Bayesian phylogenetic tree for species of the genus *Elsinoe*, reconstructed using assembled sequences of primers ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF-1  $\alpha$  F/EF-1  $\alpha$  R, Sph1 F/Sph1 R. Red text indicates the isolations obtained in this work. The bar indicates substitution per site. Nodes exemplify the posterior probability (PP). *Myriangium hispanicum*, aislamiento CBS 227.59, which belongs to another family of the same genus, was used as an external group.

Figura 5. Árbol filogenético bayesiano para las especies del género *Elsinoe*, reconstruido utilizando secuencias ensambladas de los iniciadores ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF-1  $\alpha$  F/EF-1  $\alpha$  R, Sph1 F/Sph1 R. En texto en color rojo se encuentran los aislamientos obtenidos en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo a la especie *Myriangium hispanicum*, aislamiento CBS 227.59, perteneciente a otra familia del mismo orden.

fruits with symptoms of anthracnose and *Pestalotiopsis* sp. from fruits with avocado scab symptoms. However, despite the inoculated strain of *Pestalotiopsis* sp. having reproduced a corky bark, the typical scab symptom observed in the field was not reproduced, therefore *Pestalotiopsis* sp. as the causal agent of typical scab was discarded.

*Pestalotiopsis* sp. species have been reported as pathogens of some varieties of avocado and other fruit trees such as mango, apple, banana and grape. However, the exact damage this fungus may cause in avocado fruits was unknown (Zhang *et al.*, 2003; Djeugap *et al.*, 2015). The pathogenicity tests carried out in this study showed that *Pestalotiopsis* sp. may cause a total dry necrosis of the fruit, to the extent of leaving it mummified, and in branches it causes necrosis with corky cracks. These symptoms are different to those reported for typical scab.

***Colletotrichum gloeosporioides*.** The diseases caused by *Colletotrichum* sp. include anthracnose, rotting of fruits and flowers, leaf spot, and other types of rot. It affects a wide range of crops, including avocado (Freeman *et al.*, 1998; Silva and Ávila, 2011). Because it is a fungus of rapid growth, it can enter as a secondary pathogen by using lesions caused by other fungi such as *E. perseae*. Zentmyer (1984) described that *Colletotrichum* sp. is incapable of entering the fruit directly and it is generally established in the lesions of the fruit caused by *Cercospora* sp. or *E. perseae*. Therefore, *Colletotrichum* sp. may be found as an opportunist fungus.

The pathogenicity tests for the strain identified as *C. gloeosporioides* reproduced symptoms similar to the avocado scab, which proves that other pathogens can stimulate the production of layers of cork, as described by Cruz *et al.* (2006). Plants inoculated with the strain identified as *Colletotrichum* sp. displayed an initial symptom

que avanzó por el tallo hasta la base de la rama y provocó la momificación de los frutos en plantas de las variedades Hass y Flor de María. Los síntomas menos severos se encontraron en las plantas criollas y las de la variedad Flor de María, ocasionando una necrosis parcial con grietas verticales, estos síntomas concuerdan con lo reportado por Tamayo (2007), como secamiento de ramas y mancha foliar.

Autores como Morales *et al.* (2009), han aislado a *Pestalotiopsis versicolor* de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis y a *Pestalotiopsis* sp. de frutos con síntomas de roña del aguacate. Sin embargo, a pesar de que la cepa de *Pestalotiopsis* sp. inoculada reprodujo una corchosis, no se replicó el síntoma típico de roña observado en campo, por lo que se descarta a *Pestalotiopsis* sp. como el agente causal de la roña típica.

Se han reportado especies de *Pestalotiopsis* sp. como patógenos de algunas variedades de aguacate y otros frutales como mango, manzana, plátano y uva. Sin embargo, se desconocía con exactitud los daños que puede causar este hongo en el fruto de aguacate (Zhang *et al.*, 2003; Djeugap *et al.*, 2015). En las pruebas de patogenicidad, realizadas en el presente estudio se comprobó que *Pestalotiopsis* sp. puede ocasionar una necrosis seca total del fruto, hasta dejarlo momificado, y en ramas provoca necrosis con agrietamientos corchosos. Estos síntomas son diferentes a los reportados para la roña típica.

***Colletotrichum gloeosporioides*.** Las enfermedades causadas por *Colletotrichum* sp. incluyen la antracnosis, podredumbre de frutos y flores, la mancha foliar, entre otros tipos de pudriciones; afecta a una amplia gama de cultivos, entre los que destaca el aguacate (Freeman *et al.*, 1998; Silva y Ávila, 2011). Al ser un hongo de rápido crecimiento, puede entrar como patógeno secundario al aprovechar las lesiones que provocan otros hongos como *E.*

of necrotic spots that formed corky cracks during growth, similar to those described by Everett *et al.* (2011) and Fan *et al.* (2017), caused by *E. perseae*. In stems, symptoms of necrosis were found with longitudinal cracks, similar to those reported by *Pestalotiopsis* sp., whereas in soft branches and the peduncle, the symptom was similar to the one described by Everett *et al.* (2011) as avocado scab.

***Elsinoe perseae*.** The isolation morphologically described as *E. perseae* was obtained from fruits with the symptom of “purple spot”. The initial symptoms were reproduced, which are commonly found in the field, similar to those reported by Morales (2017), and at the same time, the initial lesions coincide with reports by Jenkins in 1934 as avocado scab (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017), therefore it is synonymous with purple spot described by Morales (2017). This describes that these common names are synonymous and they are related to the same causal agent. Small circular lesions or lesions with irregular purple to violet edges were observed. It was evaluated for two months and at the end of the evaluation, the lesions reached a maximum size of 5 mm. The symptoms produced on the fruits were reisolated and the isolations obtained coincided morphologically with the inoculated strains (Figure 6).

Everett *et al.* (2011) and Fan *et al.* (2017) related *Elsinoe perseae* as the causal agent of the avocado scab. Another situation is the erroneous identification of the symptom of this disease in the field, because in the sampling of this work, other pathogens, pests and mechanical damages were proven to cause corky trunk in the pericarp of the fruit as a defense mechanism (Cruz, 2006). Therefore, the characterization and identification of the symptom is crucial for the adequate integrated management of this disease.

*perseae*. Zentmyer (1984) describió que *Colletotrichum* sp. es incapaz de entrar directamente en el fruto y generalmente se establece en las lesiones del fruto causadas por *Cercospora* sp. o *E. perseae*. Por lo tanto, es posible que *Colletotrichum* sp. se encuentre como un hongo oportunista.

Las pruebas de patogenicidad para la cepa identificada como *C. gloeosporioides* reprodujeron síntomas similares a la roña del aguacate, lo que comprueba que otros patógenos pueden estimular la producción de capas de corcho como lo describieron Cruz *et al.* (2006). Las plantas inoculadas con la cepa identificada como *Colletotrichum* sp. presentaron en el fruto un síntoma inicial de manchas necróticas que al crecer formaron grietas de aspecto corchoso, similares a las descritas por Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.* (2017) ocasionadas por *E. perseae*. En tallos se observaron síntomas de necrosis con grietas longitudinales, similares a los reproducidos por *Pestalotiopsis* sp.; mientras que, en ramas tiernas y pedúnculo, el síntoma fue similar a lo descrito por Everett *et al.* (2011) como roña del aguacate.

***Elsinoe perseae*.** El aislamiento identificado morfológicamente como *E. perseae*, se obtuvo de frutos con el síntoma de “mancha púrpura”. Se reprodujeron los síntomas iniciales, los cuales son comúnmente encontrados en campo, semejante a los reportados por Morales (2017) y a su vez las lesiones iniciales coinciden con lo reportado por Jenkins en 1934 como la roña del aguacate (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017), por lo que es sinónimo de la mancha purpura descrita por Morales (2017). Esto demuestra que estos nombres comunes son sinónimos y están asociados al mismo agente causal. Se observaron lesiones circulares pequeñas o con borde irregular de color oscuro a violáceos. Se evaluó durante dos meses y al final de la evaluación las lesiones alcanzaron un tamaño máximo de 5 mm.



Figure 6. Symptoms in fruits inoculated with A) *Elsinoe perseae*, B) *Pestalotiopsis* sp. and C) *Colletotrichum gloeosporioides*.  
Figura 6. Síntomas en frutos inoculados con: A) *Elsinoe perseae*, B) *Pestalotiopsis* sp. y C) *Colletotrichum gloeosporioides*.

## CONCLUSIONS

Sixteen different isolations were obtained, of the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* and *Epicoccum* associated with the symptom “typical scab”

*Colletotrichum gloeosporioides* did not reproduce symptoms identical to those of “typical scab” in the pathogenicity tests, since the corky bark produced penetrated the mesocarp. Meanwhile, *Pestalotiopsis* sp. Reproduced descending anthracnose and mummification of the fruits.

Twenty-five isolates of the purple blotch symptom were obtained and corresponded to the genus *Elsinoe*

The fungus identified as *E. perseae* initially reproduced irregular brown to violet spots that formed a corky bark limited to the epicarp when they joined; these symptoms are related to the disease known as “purple spot”.

Se realizó un reaislamiento de los síntomas producidos en los frutos y se obtuvieron aislamientos que coincidieron morfológicamente con las cepas inoculadas (Figura 6).

Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.* (2017) relacionan a *Elsinoe perseae* como agente causal de la roña del aguacate. Otra situación, es la identificación errónea del síntoma de esta enfermedad en campo ya que en los muestreos de este trabajo se comprobó que otros patógenos, plagas y daños mecánicos pueden provocar corchosis en el pericarpio del fruto como mecanismos de defensa (Cruz, 2006). Por lo que, la caracterización e identificación del síntoma es de suma importancia para realizar un manejo integrado adecuado de esta enfermedad.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron 16 aislamientos diferentes, los cuales corresponden a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* y *Epicoccum* asociada al síntoma de “roña típica”

The presence of *E. perseae* in Michoacán has been corroborated.

## LITERATURE CITED

- Alfaro EE, Morales GJL, Pedraza SME, Chávez BAT y Morales MKL. 2017. Hongos asociados al síndrome de la roña del aguacate en el estado de Michoacán, México. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. 1: 114-125. [http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias\\_VCLA/2017/Memorias\\_VCLA\\_2017\\_PG\\_181.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_181.pdf).
- Álvarez E, Mejía JF, and Valle TL. 2003. Molecular and pathogenicity characterization of *Sphaceloma manihoticola* isolates from south-central Brazil Plant Disease 87:1322-1328. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.11.1322>
- Anguiano CJ, Alcántar RJ, Toledo BR, Tapia VL, Ruíz CJ, Rodríguez CY. 2006. Caracterización edafo-climática del área productora de aguacate de Michoacán. INIFAP, Libro Técnico 4: 98-195. <http://www.avocadosource.com/wac6/es/Extenso/3c-112.pdf>
- Ayala EV, Santiago SV y Nava DC. 2016. Characterization of *Elsinoe pyri* associated with Apple scab in Texcoco, Mexico. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología. 34: 42-43. [https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Resumen\\_Poster\\_S342016.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Resumen_Poster_S342016.pdf)
- Barnett HL y Hunter BB. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. 1-217. [https://www.academia.edu/35499449/Illustrated\\_genera\\_of\\_imperfect\\_fungi\\_fourth\\_edition\\_Barnett\\_y\\_Hunter\\_pdf\\_pdf](https://www.academia.edu/35499449/Illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fourth_edition_Barnett_y_Hunter_pdf_pdf)
- Becerra MD. 2019. Síndrome de roña en aguacate Hass y criollos: hongos asociados, cambios fisiológicos, físicos y químicos. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Agroalimentarias. Universidad Autónoma Chapingo. 1-142. <http://repositorio.chapingo.edu.mx:8080/handle/20.500.12098/22>
- Cruz BM, Hernández FY y Rivas FE. 2006. Mecanismos de Resistencia de las Plantas al Ataque de Patógenos y Plagas. Temas de Ciencia y Tecnología, 10: 45-54. <https://biblat.unam.mx/es/revista/temas-de-ciencia-y-tecnologia/articulo/mecanismos-de-resistencia-de-las-plantas-al-ataque-de-patogenos-y-plagas>
- Djeugap FJ, Tsombeng NG, Keuete KE, Yaouba A y Serferbe S. 2015. Isolation and identification of fungi associated with avocado fruits from local markets of the west region of Cameroon. International Journal of Agriculture and Biosciences 4: 64-68. <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.1.9>
- Everett KR, Rees GJ, Pushparajah IPS, Manning MA and Fullerton RA. 2011. Molecular Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* no reprodujo síntomas idénticos a la “roña típica” en las pruebas de patogenicidad ya que la corchosis producida penetró al mesocarpio. Mientras que, *Pestalotiopsis* sp. reprodujo antracnosis descendente y momificación de los frutos.
- Se obtuvieron 25 aislamientos del síntoma de mancha púrpura que correspondieron al género *Elsinoe*.
- El hongo identificado como *E. perseae* inicialmente reprodujo manchas irregulares de color marrón a violáceas que al crecer y unirse formaron una corchosis limitada al epicarpio, síntomas asociados a la enfermedad conocida como “mancha púrpura”. Se corrobora la presencia de *E. perseae* en Michoacán.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Sphaceloma perseae* (Avocado Scab) and its absence in New Zealand. Journal of Phytopathology 159: 106-113. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01739.x>
- Fan XL, Barreto RW, Groenewald JZ, Bazerra JDP, Preira OL, Cheewangkoon R, Mostert L, Tian CM and Crous PW. 2017. Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoe* (Myrangiiales Dothideomycetes) Stud Mycol. 87:1-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.02.001>.
- Freeman S, Katan T, and Shabi E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. Plant Disease 82: 00. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.596>
- 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. <https://thalljscience.github.io/>
- Hernández y González ME. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. 31:00 [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S025859362010000400015&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362010000400015&lng=es&tlng=es).
- Holder MT y Lewis PO. 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. Nature Reviews Genetics, 4: 275-284. <http://www.apeamac.com/exportaciones-de-aguacates-de-mexico-a-estados-unidos>.
- Hyde KD, Jones EG, Liu JK, Ariyawansa H, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chumnunti P, Crous PW, Dai DQ, Diederich P, Dissanayake A, Doilom M, Doveri F,

- Hongsanan S, Jayawardena R, Lawrey JD, Li YM, Liu YX, Lucking R, Monkai J, Muggia L, Nelsen MP, Pang KL, Phookamsak R, Senana IC, Shearer CA, Suetrong S, Tanaka K, Thambugala KM, Wijayawardene NN, Wikee S, Wu H, Zhang Y, Aguirre HB, Alias SA, Aptroot A, Bahkali AH, Bezerra JL, Bhat DJ, Camporesi E, Chukeatirote E, Gueidan C, Hawksworth DL, Hirayama K, Hirayama S, Kang J, Knudsen K, Li W, Li X, Liu Z y Mapook A. 2010. Families of dothideomycetes. *Fungal diversity*, 63: 1-313. doi:10.1007/s13225-013-0263-4
- Katoh K y Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones HS, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P and Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Maddison WP y Maddison DR. 2016. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis version 3.6. [Internet]. Available from: <http://mesquiteproject.org>
- Morales GJL. 2017. Estado actual de las enfermedades del fruto del aguacate en México: roña y antracnosis. 118-121. Nuestro mexico.com, <http://www.nuestro-mexico.com/Michoacan-de-Ocampo/Ziracuaretiro/Areas-de-menos-de-500-habitantes/El-Copal/> consultada el 13 de diciembre del 2021
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. [https://www.researchgate.net/publication/285805344\\_MrModeltest\\_V2\\_Program\\_Distributed\\_by\\_the\\_Author](https://www.researchgate.net/publication/285805344_MrModeltest_V2_Program_Distributed_by_the_Author)
- Pérez AS, Leyva López NE, Magallanes-Tapia M. A., Arce-Leal P. y Méndez-Guerrero A. 2016. Contaminant fungi *in vitro* establishment of potato apices. *Cultrop*. 37: 84-88. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.26063.69284>
- Pérez R. M. 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2: 01-24. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0806/EJPSB\\_2\(1\)/EJPSB\\_2\(1\)1-24o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0806/EJPSB_2(1)/EJPSB_2(1)1-24o.pdf)
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ and Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products* 80: 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Réblova 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>
- Ronquist F, Teslenko M, Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2018. Manual de Identificación de las Principales Plagas del Aguacate en México. <https://www.gob.mx/senasica>. (Consulta septiembre del 2021).
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2022. Escenario mensual de productos agroalimentarios. <https://www.gob.mx/siap> (Consulta octubre de 2022).
- Silva RHV y Ávila QGD. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60: 899–908.
- Tamayo MPJ. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica*, 3: 51-70. <https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/62>
- Tamayo-Molano PJ. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica*, 3:51-70. <https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/62>
- Urrea JCF, y Cardona CJE 2020. Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades en aguacate Hass (*Persea americana*) en el departamento de Caldas. Programa de Agronomía Manizales. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/38446>
- Zentmyer GA. 1984. Avocado diseases. *Tropical Pest Management*, 30: 388–400. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670878409370915>
- Zhang J., Xu T. y Ge Q. 2003. Notes on Pestalotiopsis from southern China. *Mycotaxon*, 85: 91-92. [https://www.researchgate.net/publication/296529293\\_Notes\\_on\\_Pestalotiopsis\\_from\\_southern\\_China](https://www.researchgate.net/publication/296529293_Notes_on_Pestalotiopsis_from_southern_China)
- Zhi L, Huan D, Xiao Y, Jingyuan H, Zhiqi H and Xiping W. 2018. Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelia*, the causal organism of grapevine anthracnose. *Journal of phytopathology*. 166: 1-9. <https://doi.org/10.1111/jph.12702>



# Effectors: key actors in phytopathology

## Efectores: actores claves en la fitopatología

Jewel Nicole Anna Todd, Karla Gisel Carreón-Anguiano, Osvaldo Jhosimar Couoh-Dzul, Cesar de los Santos-Briones, Blondy Canto-Canché\*. Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México, C.P. 97205.

\*Corresponding autor: cantocanche@cicy.mx

Received: October 30, 2022.

Accepted: March 22, 2023.

Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Couoh-Dzul OJ, de los Santos-Briones C and Blondy Canto-Canché. 2023. Effectors: key actors in phytopathology. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 203-228.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-4>

First DOI publication: April 10, 2023.

Primera publicación DOI: 10 de Abril, 2023.

**Abstract.** Effectors are small molecules, mostly proteins, produced by microorganisms that use them to interact with their hosts. Regarding plant hosts, effectors suppress plant immunity by interfering with microorganism perception, signaling, and biosynthesis of phytohormones, among other processes. In recent years, interest in effectors in phytopathology has grown due to their contribution to phytopathogen virulence and, by extension, their impact on agricultural production. However, effector molecules are complex. On one hand, these molecules are secreted for the benefit of the phytopathogen and often trigger disease susceptibility. However, plants have evolved receptors that recognize some effectors, and this recognition can trigger

**Resumen.** Los efectores son moléculas pequeñas, mayormente proteínas, producidas por los microorganismos que las utilizan para interactuar con sus hospederos. En el caso de los hospederos vegetales, los efectores suprimen la inmunidad vegetal interfiriendo en la percepción del microorganismo, la señalización y la biosíntesis de fitohormonas, entre otros procesos. En los últimos años ha crecido el interés de los efectores en la fitopatología debido a su contribución en la virulencia de los fitopatógenos y, por ende, en el impacto de éstos en la producción agrícola. Sin embargo, los efectores son complejos. Por un lado, estas moléculas son secretadas para el beneficio del fitopatógeno y suelen desencadenar susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, las plantas han desarrollado receptores que reconocen a algunos efectores y este reconocimiento desencadena resistencia a la enfermedad. Es decir, algunos efectores resultan en salud vegetal, mientras otros determinan el desarrollo de la enfermedad. Esta revisión se enfoca en los efectores de los fitopatógenos y sus funciones, así como los mecanismos que muchos usan para vencer la inmunidad innata vegetal, por lo que son actores claves en la fitopatología. Por último, se describen los potenciales usos de los efectores en el sector agrícola y los retos asociados con su aplicación.

disease resistance. Essentially, some effectors safeguard plant health, while others promote disease development. This review focuses on the effectors of phytopathogens and their functions, as well as the mechanisms that many of them use to overcome plant innate immunity, making them key players in phytopathology. Finally, the potential uses of effectors in the agricultural sector and the challenges associated with their application are described.

**Key words:** Protein effectors, effectoromics, plant-pathogen interaction, R proteins, cognates, crop protection, phytopathology

All plants, including those of the highest agricultural importance in the world such as rice, maize, soybeans and wheat, are affected by severe infections caused by pathogens such as bacteria, fungi, oomycetes and viruses (Nazarov *et al.*, 2020; Velásquez *et al.*, 2018). Infections caused by *Magnaporthe oryzae* in rice, *Puccinia* spp. in wheat and *Fusarium* spp. in all cereals, for example, contribute to losses in yield and quality of harvests globally (Almeida *et al.*, 2019). Agronomic losses caused by pests and diseases are estimated to cover up to 40% of the world's annual production (FAO, 2017). Incidences of plant diseases reduce food production and increase production costs, making them less accessible to the consumer (Ristaino *et al.*, 2021; Savary *et al.*, 2019). In addition, they reduce the diversity of species of, for example, beneficial insects and microbes (Gupta *et al.*, 2022; van der Sluijs, 2020) and pose a risk to human health due to the indiscriminate use of pesticides for the control of plant pathogen populations (Rani *et al.*, 2021).

The study of key factors that hinder or determine the development of plant diseases may help develop

**Palabras claves:** Efectores proteicos, efectorómica, interacción planta-patógeno, proteínas R, cognados, protección vegetal, fitopatología

Todas las plantas, incluyendo las de mayor importancia agrícola en el mundo, como el arroz, el maíz, la soya y el trigo se ven afectados por severas infecciones causadas por fitopatógenos como bacterias, hongos, oomicetos y virus (Nazarov *et al.*, 2020; Velásquez *et al.*, 2018). Las infecciones causadas por *Magnaporthe oryzae* en arroz, *Puccinia* spp. en trigo y *Fusarium* spp. en todos los cereales, por ejemplo, contribuyen a las pérdidas en rendimiento y calidad de la cosecha de manera global (Almeida *et al.*, 2019). Se estiman que las pérdidas agronómicas causadas por plagas y enfermedades abarcan hasta 40% de la producción global anual (FAO, 2017). Las incidencias de las enfermedades vegetales reducen la producción de alimentos y aumentan el costo de producción, haciéndoles menos accesibles al consumidor (Ristaino *et al.*, 2021; Savary *et al.*, 2019) Además, reducen la diversidad de las especies, por ejemplo, de insectos y microbios benéficos (Gupta *et al.*, 2022; van der Sluijs, 2020), y presentan un riesgo a la salud humana debido al uso indiscriminado de pesticidas para controlar las poblaciones de los fitopatógenos (Rani *et al.*, 2021).

Centrar esfuerzos en el estudio de factores claves que impiden o determinan el desarrollo de la enfermedad vegetal puede permitir el desarrollo de métodos de control eco-amigables que reduzcan el control químico (Thakur *et al.*, 2020; Baker *et al.*, 2020). El objetivo de esta revisión es mostrar la importancia de los effectores en la fitopatología y proponer sus potenciales usos para la protección vegetal. Para esta revisión se buscaron artículos con palabras clave como “efectores proteicos”, “efectores en interacciones planta-patógeno”, “aplicaciones

eco-friendly control methods that reduce chemical control (Thakur *et al.*, 2020; Baker *et al.*, 2020). The aim of this revision is to show the importance of effectors in phytopathology and to propose potential uses for the protection of plants. For this revision, we searched for articles with key words such as “protein effectors”, “effectors in plant-pathogen interactions”, “applications of effectors” and “effectoromics in pathogenic fungi” in the Google Scholar and PubMed databases. Articles from the past 15 years were selected, with a greater emphasis on the last 5 years, along with some older articles which are important references in the area of effectors.

Many effectors play roles in the suppression of immune responses in host plants; some effectors are hydrolytic enzymes, others are enzyme inhibitors, others modulate the microbiome of the host or protect the pathogen physically against enzymatic lysis (Rocafort *et al.*, 2020; Schreiber *et al.*, 2021; Snelders *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

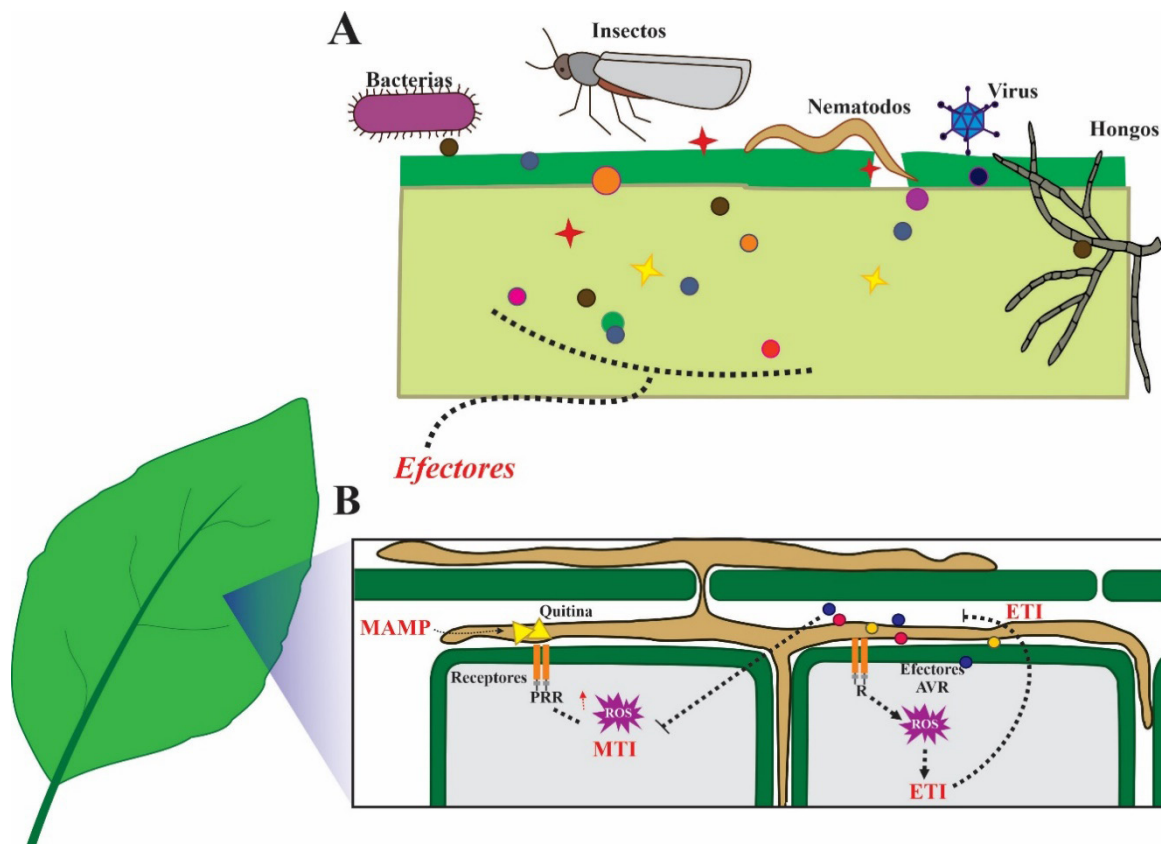
The effectors are part of the molecular arsenal of microorganisms, both beneficial and pathogenic, that interact with the host plant or with other microorganisms (Castillo-Sanmiguel *et al.*, 2020; Todd *et al.*, 2022a). However, these molecules have been studied mostly in the context of plant pathogens, since they are key tools used by the phytopathogen to cause an infection and thereby obtain necessary nutrients from the host. They have been found in fungal (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Sperschneider *et al.*, 2018), bacterial (Rufián *et al.* 2021), viral phytopathogens (Huang, 2021) and even larger organisms such as insects (Chen *et al.* 2019; Ray and Casteel, 2022) and nematodes (Figure 1A) (Verhoeven *et al.*, 2023; Vieira and Gleason, 2019). The development of the omic technologies (genomics, transcriptomics and proteomics), as well as bioinformatics, has helped identify wide catalogues of effectors contained in

de efectores” y “efectorómica en hongos patógenicos” en las bases de datos de Google Scholar y PubMed. Se seleccionaron artículos de los últimos 15 años, con mayor énfasis en los últimos cinco años; también se incluyeron algunos artículos más antiguos que son referentes en el área de los efectores.

Muchos efectores desempeñan un papel en la supresión de las respuestas inmunitarias de la planta hospedera; algunos efectores son enzimas hidrolíticas, otros son inhibidores de enzimas, otros juegan un papel en modular el microbioma del hospedero o protegen físicamente al patógeno contra lisis enzimática (Rocafort *et al.*, 2020; Schreiber *et al.*, 2021; Snelders *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

Los efectores forman parte del arsenal molecular de los microorganismos, tanto benéficos como patógenicos, que interactúan con la planta hospedera o con otros microorganismos (Castillo-Sanmiguel *et al.*, 2020; Todd *et al.*, 2022a). Sin embargo, estas moléculas se han estudiado mayormente en el contexto de los fitopatógenos, ya que son herramientas clave empleadas por el fitopatógeno para lograr una infección y obtener los nutrientes del hospedero. Se han encontrado en fitopatógenos fúngicos (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Sperschneider *et al.*, 2018), bacterianos (Rufián *et al.* 2021), virales (Huang, 2021) hasta organismos más grandes como los insectos (Chen *et al.* 2019; Ray y Casteel, 2022) y nematodos (Figura 1A) (Verhoeven *et al.*, 2023; Vieira y Gleason, 2019). El desarrollo de las tecnologías ómicas (genómica, transcriptómica y proteómica) así como de programas bioinformáticos, han permitido la identificación e investigación de amplios catálogos de efectores contenidos en los genomas de los organismos (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2022).

La identificación y caracterización de los efectores son actividades sumamente importantes, porque dan la pauta para comprender mejor cómo los



**Figure 1.** The pathogen-plant molecular interaction. A) Effectors, the molecular weapons of phytopathogens and pests. Bacteria, fungi, oomycetes, viruses, insects and nematodes secrete a plethora of effectors targeting the plant host, preventing their recognition by said host and blocking the host immune response to favor colonization. B.) On the other hand, the plants, in the first line of defense, recognize conserved molecules known as MAMPs (e.g., fungal chitin) that activate the defense mechanism called MTI. In the second line of plant defense, resistance proteins (R) recognize Avr effectors of the pathogen. This induces the hypersensitive response and localized cell death to prevent further infection (ETI). When R proteins are incapable of recognizing the Avr effector, effector-triggered susceptibility (ETS) ensues, and the disease is established.

**Figura 1.** Interacción patógeno-hospedero. A) Efectores, las armas moleculares de fitopatógenos y plagas. Las bacterias, hongos, oomicetos, virus, insectos y nematodos son capaces de secretar una plétora de efectores hacia el hospedero, que les permiten impedir su reconocimiento por la planta, bloquear la respuesta inmune y favorecer su propio desarrollo. B) Por su parte, las plantas, en la primera línea de defensa, reconocen “patrones moleculares asociados a microorganismos” (MAMP, por sus siglas en inglés), que son moléculas conservadas, como la quitina de los hongos y activa el mecanismo de defensa MTI. En otra línea de defensa vegetal, las proteínas de resistencia (R) reconocen los efectores Avr del patógeno, lo que induce la respuesta de hipersensibilidad y la muerte localizada de las células del hospedero para contener la infección (ETI). Cuando las proteínas R son incapaces de reconocer al efector, se desarrolla la susceptibilidad mediada por el efector y se establece la enfermedad.

the genomes of organisms (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2022).

The identification and characterization of effectors are extremely important activities, since they provide clues as to how phytopathogens infect

fitopatógenos infectan a sus hospederos, causando reducciones masivas en el rendimiento de los cultivos y amenazando la seguridad alimentaria a nivel mundial. El estudio de los efectores está abriendo un camino para su aplicación en el sector agrícola,

their hosts, causing massive reductions in crop yields, threatening food security worldwide. The study of effectors is paving the way for their use in agriculture, providing an opportunity for the creation of new methods to control phytopathogens within integrated management systems.

### Effectors and their characteristics

Effectors are defined as small molecules, generally secreted, which manipulate the structure and the function of the host cell, allowing the microorganism to establish an interaction with the host (Fabro, 2022; Langin *et al.*, 2020). These molecules produce physical and physiological changes in the target organisms (the organisms upon which they act) and in some cases, on the same microorganisms that produce them (Cai *et al.*, 2023; Figueroa *et al.*, 2021; He *et al.*, 2020). Most of the effectors known today are proteins (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Kanja and Hammond-Kosack, 2020; Sperschneider and Dodds, 2022), although secondary metabolites (Rangel and Bolton, 2022), and small RNAs have also been described (Yamankurt *et al.*, 2020).

Most of the known effectors are not conserved among different organisms, therefore the *in silico* predicative identification approaches have been based on relatively wide structural criteria, mainly (a) the number of amino acids (usually less than 400 amino acids); b) the presence of a signal peptide, which increases the probability of the protein exiting the phytopathogen cells (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Sperschneider *et al.*, 2018; Sperschneider and Dodds, 2022); c) the number or percentage of the amino acid cysteine, as many apoplast effectors are rich in this amino acid; and (d) candidates are also selected based on the absence of transmembrane domains (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020). Other characteristics help

lo cual involucra la creación de nuevos métodos para controlar las poblaciones de fitopatógenos en los sistemas de manejo integrado.

### Los efectores y sus características

Los efectores se definen como pequeñas moléculas, generalmente secretadas, que manipulan la estructura y función de la célula hospedera, permitiendo que el microorganismo establezca una interacción con el hospedero (Fabro, 2022; Langin *et al.*, 2020). Estas moléculas producen cambios físicos y fisiológicos en los organismos diana (los organismos sobre los cuales actúan) y, en algunos casos, en los propios microorganismos que los producen (Cai *et al.*, 2023; Figueroa *et al.*, 2021; He *et al.*, 2020). La mayoría de los efectores conocidos hoy en día son de naturaleza proteica (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Kanja y Hammond-Kosack, 2020; Sperschneider y Dodds, 2022), aunque también se han descrito metabolitos secundarios (Rangel y Bolton, 2022) y ARN pequeños (Yamankurt *et al.*, 2020).

La mayoría de los efectores conocidos no están conservados entre diferentes organismos, por lo que los enfoques de identificación *in silico* (predicción) se han basado en: a) criterios estructurales relativamente amplios, principalmente la longitud del número de aminoácidos (usualmente menos de 400 aminoácidos); b) presencia de señal de secreción, que aumenta la probabilidad de la salida de la proteína de las células del fitopatógeno (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Sperschneider *et al.*, 2018; Sperschneider y Dodds, 2022); c) el número o porcentaje del aminoácido cisteína, ya que los efectores son ricos en este aminoácido; d) y también se seleccionan candidatos basados en la ausencia de dominios transmembranales (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020). Existen otras características que ayudan a refinar su identificación, como es el incremento

refine their identification, such as the increase in their expression during the interaction of the phytopathogen with its host (Tao *et al.*, 2020; Toruño *et al.*, 2016). Likewise, in the amino acid sequences of the protein effectors, small conserved regions called motifs can be identified, such as RxLR, CHXC or LFLAK, common in oomycete effectors (Fabro *et al.*, 2022).

Some effectors are codified by genes found in dispensable chromosomes (named as such because these chromosomes are not present in all the microorganism strains, unlike the indispensable ones) or in chromosomal regions rich in repetitions and with a scarce gene density (Peng *et al.*, 2019). Noar and Daub (2016) analyzed the distribution of genes related to virulence in the fungus *Pseudocercospora fijiensis* and found that most are located in “dispensable” genomic regions, and using transcriptomic analysis, they found that these genes are expressed during the *P. fijiensis* infection of banana (*Musa acuminata*). Using EffHunter, an algorithm that integrates the canonical characteristics of the effectors (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020), 136 effectors were predicted for *P. fijiensis*; these effectors are distributed in dispensable genomic regions, as well as in the genomic regions found in all strains, known as the “core” genome.

The genes that codify effector proteins are under high evolutionary pressure, which results in a higher mutation rate in these genes than in other gene families. Consequently, polymorphisms are commonly found in the sequences of effectors shared among strains of the same species; such changes are related to the adaptation and virulence on the host (Kanja and Hammond-Kosack, 2020; Padilla-Ramos *et al.*, 2018). Regarding the level of conservation, some effectors are found in related microorganisms, and others, in phylogenetically distant organisms. In these cases, orthologous

de su expresión durante la interacción del fitopatógeno con su hospedero (Tao *et al.*, 2020; Toruño *et al.*, 2016). Asimismo, en las secuencias de aminoácidos de los efectores proteicos se pueden identificar pequeñas regiones conservadas llamadas motivos, por ejemplo, los motivos RxLR, CHXC, o LFLAK, frecuentes en los efectores de los oomicetos (Fabro *et al.*, 2022).

Algunos efectores están codificados por genes que se encuentran en cromosomas dispensables (llamados así porque no están presentes en todas las cepas de un microorganismo; contrario de los indispensables) o en regiones cromosómicas ricas en repeticiones y con escasa densidad de genes (Peng *et al.*, 2019). Noar y Daub (2016) analizaron en el hongo *Pseudocercospora fijiensis* la distribución de los genes relacionados con la virulencia, encontrando que la mayoría se localiza en regiones genómicas “dispensables”, y mediante análisis transcriptómico se observó que estos genes se expresan durante la infección del banano (*Musa acuminata*). Mediante el empleo de EffHunter, un algoritmo que integra las características canónicas de los efectores (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020) se predijeron 136 efectores en *P. fijiensis*, y éstos se distribuyen tanto en las regiones genómicas dispensables como también en las regiones genómicas presentes en todas las cepas, conocido como genoma “core”.

Los genes que codifican proteínas efectoras están bajo alta presión evolutiva, lo que lleva a una tasa de mutación más elevada que en otras familias de genes. En consecuencia, es común observar polimorfismos en las secuencias de efectores entre los aislados de una especie, cambios asociados con la adaptación y virulencia sobre el hospedero (Kanja y Hammond-Kosack 2020; Padilla-Ramos *et al.*, 2018). Con respecto al nivel de conservación, algunos efectores están presentes en microorganismos relacionados, y algunos entre organismos

proteins (proteins that are homologous proteins in sequence, having the same function in different organisms and originating from one the same ancestor) display little sequence similarity. A clear example is the effector Avr4, which is shared between species of the same class of Dothidiomycetes; Avr4 in *P. fijiensis* only displays 50.5% identity with its orthologous protein in the fungus *Cladosporium fulvum* (Hurlburt *et al.*, 2018).

Even though the percentage of identity between the members of an effector family tends to be low, the current omic analyses show the presence of conserved domains and motifs in effector proteins. Some of the most frequently identified domains include LysM, ceratoplatanin, RNAase, necrosis inducing protein domains (NPP1 or NEP), CFEM, among others (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Outram *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020). Recent investigations reveal that a microorganism can contain hundreds of effectors (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Noar and Daub, 2016; Sperschneider *et al.*, 2018), with different functions that are expressed in different moments (Noar and Daub, 2016; Toruño *et al.*, 2016). Most of them interfere with signaling functions in the plant, the synthesis of phyto regulators or in plant defense mechanisms (Fabro 2022; Han yand Kahmann, 2019; Padilla-Ramos *et al.*, 2018; Plett *et al.*, 2020).

### **Effectors and plant immunity (disease or health)**

Plants have an innate immune system that responds to the presence of phytopathogens (Chang *et al.*, 2022; Jones and Dangl 2006; Thordal-Christensen, 2020). Plants recognize conserved molecules called microbial-associated molecular patterns, or MAMP, and the recognition triggers the primary immune response (basal defense). The immunity activated by these MAMP involves the participation of receptors in the plant that

filogenéticamente distantes. En estos casos, las proteínas ortólogas (es decir proteínas homólogas en secuencia, que tienen la misma función en organismos diferentes y provienen de un ancestro común) presentan poca similitud de secuencia. Un claro ejemplo es el efector Avr4, ya que es un efector compartido entre especies de la misma clase de Dotidiomicetos; el Avr4 de *P. fijiensis* solo presenta 50.5% de identidad con su proteína ortóloga en el hongo *Cladosporium fulvum* (Hurlburt *et al.*, 2018).

A pesar de que el porcentaje de identidad entre los miembros de una familia de efectores suele ser baja, los análisis ómicos realizados actualmente evidencian en los efectores la presencia de dominios y motivos proteicos conservados. Entre los dominios más frecuentemente identificados están LysM, ceratoplatanina, ARNasa, inductor de necrosis (NPP1 o NEP), CFEM, entre otros (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Outram *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020). Investigaciones recientes revelan que cada microorganismo puede poseer cientos de efectores (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Noar y Daub, 2016; Sperschneider *et al.*, 2018), con diferentes funciones, que se expresan en diferentes momentos (Noar y Daub, 2016; Toruño *et al.*, 2016). La mayoría interfiere con funciones de señalización en la planta, la síntesis de fitorreguladores o en los mecanismos de defensa (Fabro 2022; Han y Kahmann, 2019; Padilla-Ramos *et al.*, 2018; Plett *et al.*, 2020).

### **Efectores y la inmunidad vegetal (enfermedad o salud)**

Las plantas tienen un sistema inmunológico innato que responde a la presencia de los fitopatógenos (Chang *et al.*, 2022; Jones y Dangl 2006; Thordal-Christensen, 2020). Las plantas reconocen moléculas conservadas llamadas “patrones

recognize these molecular patterns (PRR) and trigger the MAMP-triggered Immunity (MTI). MAMP molecules include chitin and glucan in fungi, bacterial flagellin, among others (Alhoraibi *et al.*, 2019; Zhou y Zhang, 2020). This detection takes place in the apoplast of plant cells and the plant defends itself by producing reactive oxygen species (ROS), antimicrobial compounds and hydrolytic enzymes. Phytopathogens respond by secreting effectors, which allow it to deactivate the immunity response or overcome the effects of the host's defense mechanism. In their coevolution, plants have developed a second line of defense, the effector-triggered immunity (ETI), which involves the detection of avirulence effectors (Avr effectors) (Figure 1B). The proteins that recognize the Avr effectors are intracellular receptors known as resistance proteins (R), or cognates, and they play a very important part in genetic breeding programs (Ghislain *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Thordal-Christensen, 2020). All plants have a wide family of resistance genes; for example, in the genome of *Arabidopsis thaliana*, over 200 genes are predicted which codify leucine-rich repeat receptor-like protein kinases (LRR-RLK), one type of R gene family (Wu *et al.*, 2016).

The interaction between the avirulence factors and the R proteins is a ubiquitous one in nature, but it was first described in the interaction between the biotrophic fungus *Melampsora lini* and the plant *Linum usitatissimum* (Flor, 1942). In the absence of the protein R or cognate, or in the presence of a protein R incapable of recognizing the effector, the ETI defense mechanism is not induced and instead, the effector promotes phytopathogen virulence (Jones and Dangl 2006; Todd *et al.*, 2022a). This leads to effector-triggered susceptibility (ETS) and the expression of the Avr effector genes typically reaches its peak in the first stages of the infection. Conversely, when the Avr protein

moleculares asociados a microorganismos” (MAMP, por sus siglas en inglés), y el reconocimiento desencadena la respuesta inmune primaria (defensa basal). La inmunidad activada por estos MAMP involucra la participación en la planta de receptores que reconocen esos patrones moleculares (PRR), y disparan la respuesta de inmunidad (MTI, por “MAMP-Triggered Immunity”). Entre las moléculas MAMP se encuentran la quitina y el glucano de los hongos, la flagelina bacteriana, entre otros (Alhoraibi *et al.*, 2019; Zhou y Zhang, 2020). Esta detección ocurre en el apoplasto de las células vegetales y la planta se defiende produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. Los fitopatógenos responden secretando efectores, que le permiten inactivar la respuesta de inmunidad o superar los efectos de los mecanismos de defensa del hospedero. En su coevolución, las plantas han desarrollado una segunda línea de defensa, la inmunidad desencadenada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés), que involucra la detección de los efectores de avirulencia (efectores Avr) (Figura 1B). Las proteínas que reconocen a los efectores Avr son receptores intracelulares conocidas como proteínas de resistencia (R), también llamados cognados, y juegan un papel muy importante en los programas de mejoramiento genético (Ghislain *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Thordal-Christensen, 2020). Todas las plantas tienen una amplia familia de genes de resistencia; por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se predicen más de 200 genes que codifican receptores tipo quinasa con motivos repetidos ricos en leucina (LRR-RLK), una clase de genes R (Wu *et al.*, 2016).

La relación entre los factores de avirulencia con la proteína R, es una interacción ubicua en la naturaleza, pero fue descrita primero en la interacción entre el hongo biótrofo *Melampsora lini* y la planta *Linum usitatissimum* (Flor, 1942). En ausencia de



of the phytopathogen is recognized, an important phenomenon of ETI called the hypersensitive response (HR) is triggered. The HR is unfavorable for the phytopathogen since it produces localized cell death in the host at the site of infection; this prevents further pathogen invasion, keeping the plant healthy. This molecular interaction is key to the incompatible plant-pathogen interaction, which involves a resistant host and an avirulent phytopathogen that is unable to counteract the defense of the plant. On the contrary, the association of the phytopathogen with the susceptible host results in a compatible interaction through the ETS (He *et al.*, 2020; Thordal-Christensen, 2020; Todd *et al.*, 2022a).

### Characterization of effectors

*In silico* identification of effectors in microbial genomes has resulted in tens or hundreds of effector candidates (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Sperschneider *et al.*, 2018) which must be experimentally validated to determine if they are indeed true effectors.

*Nicotiana benthamiana* has been widely used as a model plant to transiently express the effectors and study the phenotype that results from this expression; its success as a model plant is due to its small size, fast growth and its ease of genetic manipulation. The most widely used method for functional analysis is “agroinfiltration”, which involves the transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with an expression vector that contains the complete codifying region of the effector; later, the transformed bacteria is infiltrated in the *N. benthamiana* leaves (Figure 2). True effectors are identified because they generate a particular phenotype as a result of the HR. Most produce characteristic lesions on the leaf, between chlorotic and necrotic, due to their presence activating

la proteína R o cognado, o en presencia de una proteína R incapaz de reconocer al efector, no se enciende el mecanismo ETI de protección y defensa y el efector promueve la virulencia del fitopatógeno (Jones y Dangl 2006; Todd *et al.*, 2022a). Esto conlleva a la susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS, por sus siglas en inglés); la expresión de los genes efectores Avr típicamente alcanza su punto máximo en las primeras etapas de la infección. Cuando la proteína Avr del fitopatógeno es reconocida, se desencadena la respuesta de hipersensibilidad (RH), un fenómeno importante de la ETI. La RH es desfavorable para el fitopatógeno debido a la muerte celular localizada del hospedero, que se produce en el sitio de infección y evita la invasión, manteniendo a la planta sana. Esta interacción molecular es clave en la interacción incompatible, que involucra un hospedero resistente y un fitopatógeno cuya virulencia no es suficiente para contrarrestar la defensa vegetal. Por el contrario, la asociación del fitopatógeno con el hospedante susceptible resulta en una interacción compatible a través del ETS (He *et al.*, 2020; Thordal-Christensen, 2020; Todd *et al.*, 2022a).

### Caracterización de los efectores

La búsqueda *in silico* de efectores en los genomas microbianos resulta en decenas o cientos de candidatos a efectores (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Sperschneider *et al.*, 2018); los cuales se deben validar experimentalmente para comprobar si son efectores verdaderos y en consecuencia estudiar su función.

*Nicotiana benthamiana* se ha utilizado ampliamente como planta modelo para expresar a los efectores de manera transitoria y estudiar el fenotipo que resulta de dicha expresión; su éxito como planta modelo es debido a su tamaño pequeño, crecimiento rápido y facilidad de manipulación

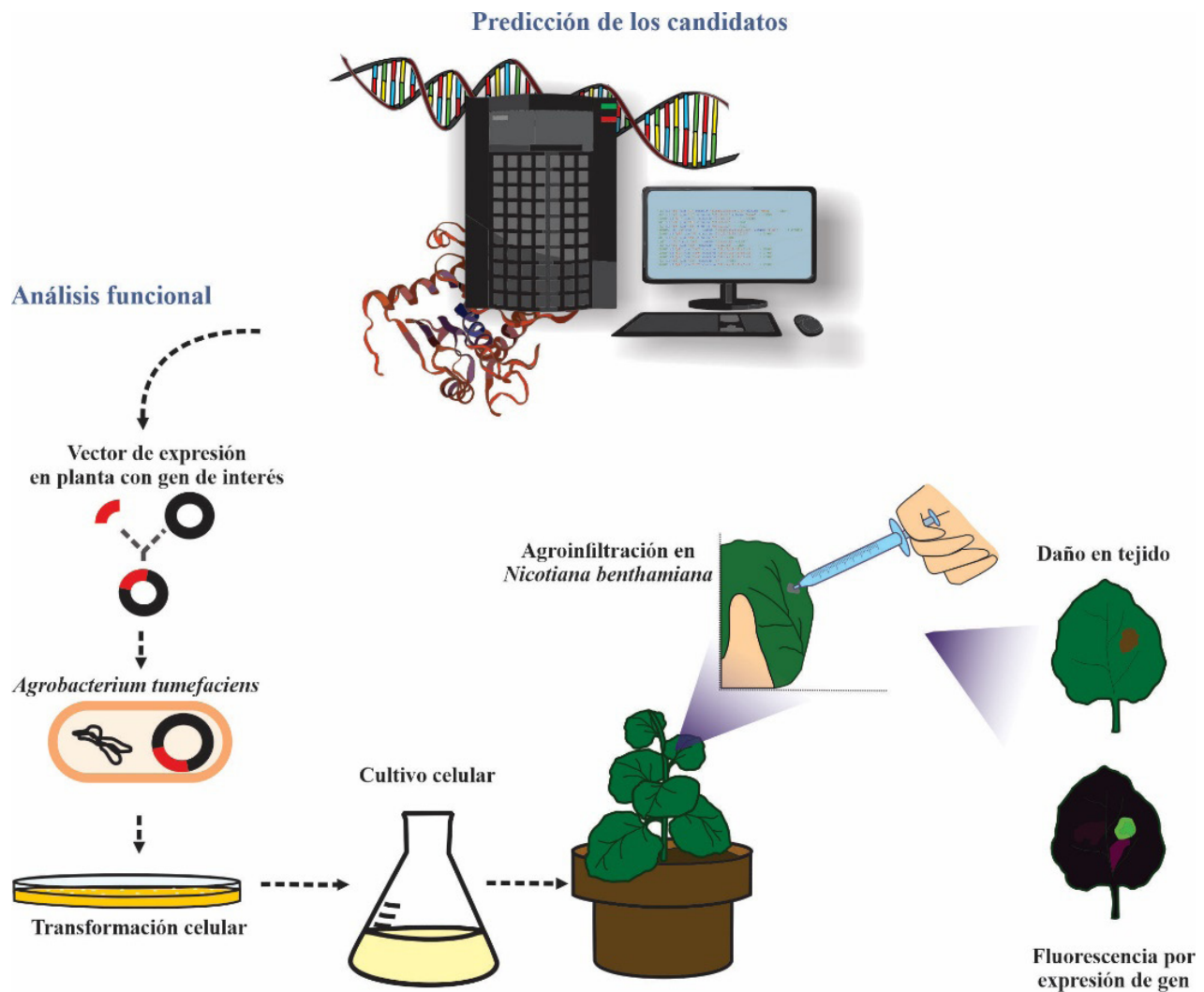


Figure 2. Effector functional analysis workflow. Effectors are first identified through bioinformatics, and some are later selected for functional analysis. The full-length coding sequence is cloned in *Agrobacterium tumefaciens*, then inoculated in leaves of the model plant, *Nicotiana benthamiana*. Effectors can be recognized by the plant receptors resulting in lesions on the leaves produced by the hypersensitive response. However, biotrophic effectors are identified because they can suppress the hypersensitive response in plants that have been made to express a particular R protein; for their characterization, the effector recognized by this R protein is co-agroinfiltrated with the putative biotrophic-associated effector.

Figura 2. Flujo de investigación en la efectorómica. Los efectores son identificados primero *in silico* mediante bioinformática y aquellos seleccionados son evaluados mediante análisis funcional. La secuencia completa de la región codificante es clonada en *Agrobacterium tumefaciens*, y luego inoculada en las hojas de la planta modelo *Nicotiana benthamiana*. Los efectores que son reconocidos por alguno de los receptores de la planta generan lesiones en las hojas o, por el contrario, en el caso de los efectores biotróficos éstos se reconocen porque pueden suprimir la respuesta hipersensible en plantas en las que se haya clonado una proteína R determinada y se co-agroinfiltra el effector que reconoce esa proteína cognada, junto con el candidato en evaluación que se sospecha es effector asociado a un organismo biotrófico.

systemic acquired resistance (Jones and Dangl, 2006; Porras *et al.*, 2022). In turn, other effectors, such as those from biotrophic phytopathogens, characteristically hinder the activation systemic acquired resistance and HR (Zhang *et al.*, 2022). The success of *N. benthamiana* or *Arabidopsis thaliana* as model plants to identify phytopathogen effectors that do not infect them naturally has been described as non-host resistance (NHR). This form of resistance refers to the resistance displayed by a plant species against all the genetic variants of a non-adapted phytopathogen species (Wu *et al.*, 2023).

Several techniques are currently in use to explain the function of effectors. The most common techniques interfere with their expression, such as the generation of “knock out” mutants, which eliminates the gene from the pathogen’s genome, “knock down” or gene silencing using RNA interference (RNAi), which does not eliminate the gene, but interferes post-transcriptionally on the mRNA, preventing its correct translation, and finally, gene editing with CRISPR/Cas9 (Kanja and Hammond-Kosack, 2020). By interrupting the gene’s function, the evaluation determines whether the virulence in a susceptible host is lost (or reduced) to prove that the candidate is a true effector, and a possible protein of interest in phytopathology (Kanja and Hammond-Kosack, 2020).

Other analysis to characterize the effector involves cloning it as a chimeric protein, fusing the codifying region of the effector with a fluorescent protein. This helps determine its subcellular location, that is, whether it is apoplastic or if the protein localizes to intracellular organelles, which helps later locate their target proteins (Camborde *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2022). Identifying and characterizing effectors continue to be challenging tasks. Despite their studies having started 80 years ago (Flor, 1942), by 2020, the functions of only

genética. El método más empleado para el análisis funcional es el de “agroinfiltración”, el cual involucra la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con un vector de expresión que contenga la región codificante completa del efector de interés; posteriormente la bacteria transformada se infiltra en hojas de *N. benthamiana* (Figura 2). Los efectores verdaderos son identificados porque generan un fenotipo particular como resultado de la RH. La mayoría produce lesiones características entre cloróticas y necróticas en la hoja, debido a que su presencia activa la reacción sistémica adquirida (Jones y Dangl 2006; Porras *et al.*, 2022). En cambio, otros efectores, por ejemplo, de fitopatógenos biotróficos, se identifican por impedir la activación de la reacción sistémica adquirida y la RH (Zhang *et al.*, 2022). El éxito de *N. benthamiana* o de *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para identificar efectores de los fitopatógenos que no la infectan naturalmente se ha descrito como resistencia inespecífica (NHR, “non-host resistance”). Esta forma de resistencia se refiere a la resistencia exhibida por una especie vegetal contra todas las variantes genéticas de una especie de fitopatógeno no adaptado (Wu *et al.*, 2023).

Actualmente, existen varias técnicas para elucidar la función de los efectores. Las técnicas más comunes interfieren con su expresión, como la generación de mutantes “knock out” en la que se elimina el gen del genoma del patógeno, el “knock down” o silenciamiento génico utilizando ARN de interferencia (ARNi) que no elimina el gen, pero interfiere pos-transcripcionalmente sobre el ARNm, impidiendo su correcta traducción, y la edición génica con CRISPR/Cas9 (Kanja y Hammond-Kosack, 2020). Al interrumpir la función del gen, se evalúa si la virulencia sobre un hospedero susceptible se pierde (o se reduce) para comprobar que el candidato es un effector verdadero, y una posible proteína de interés en la fitopatología (Kanja y Hammond-Kosack, 2020).

150 true fungal effectors were known (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020), although the number has increased significantly and to date, more than 300 effectors have been discovered (Nur *et al.*, 2021; Sperschneider and Dodds, 2022).

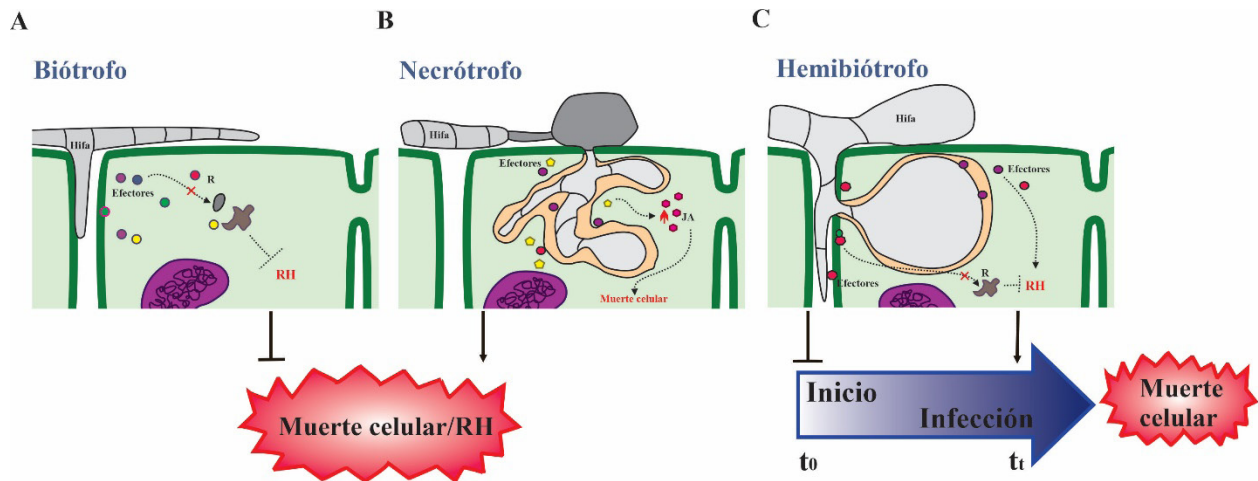
### Functions of the effectors

Effectors participate in all plant-microbe interactions; in negative interactions with phytopathogens as well as in interactions between plants and beneficial microorganisms, such as mycorrhizae (Plett *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2020), and recently, they were also discovered in microbe-microbe interactions (Snelders *et al.*, 2020; Snelders *et al.*, 2021). Regarding phytopathogens, the effector functions reflect their lifestyles; for example, biotrophic phytopathogens require a live host to complete their infection cycle, whereas necrotrophic phytopathogens require dead tissue to obtain their nutrients. On the other hand, hemibiotrophic phytopathogens are a combination of the previous two; they obtain their nutrients from live tissue first and from dead tissue at the end of their infection cycle. While the effectors of biotrophic organisms usually work by blocking the host's immune response; the effectors from necrotrophs trigger the host's defense mechanism, but in an uncontrolled manner that is intense and not localized, inducing host cell death. Hemibiotrophic phytopathogens initially produce effectors that suppress the immune response and cell death, but later, in the necrotrophic phase, they secrete effectors that induce host cell death (Castillo-Sanmiguel *et al.*, 2022; Jones and Dangl, 2006; Thordal-Christensen, 2020; Todd *et al.*, 2022a) (Figure 3). For example, in *Botrytis cinerea*, the effector BcNEP1 shows strong expression at the initial phase of the infection, whereas effectors BcSSP2 and BcNEP2 are expressed later on (Zhu *et al.*, 2022). Similarly, in *Colletotrichum* spp., a

Otros análisis para caracterizar al efector es su clonación como quimera, fusionando la región codificante del efector con una proteína fluorescente. Esto permite definir su localización subcelular, es decir, si es apoplástica o si la proteína se dirige a los organelos intracelulares, lo que ayuda a buscar posteriormente sus proteínas diana (Camborde *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2022). Identificar y caracterizar efectores continúan siendo tareas desafiantes. A pesar de que comenzaron a estudiarse hace 80 años (Flor, 1942), en 2020 sólo se conocían las funciones de 150 efectores verdaderos fúngicos (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020), pero el número se ha incrementado significativamente y hoy se conocen más de 300 efectores (Nur *et al.*, 2021; Sperschneider y Dodds, 2022).

### Funciones de los efectores

Los efectores participan en todas las interacciones planta-microbio, tanto en las interacciones negativas con los fitopatógenos, como en las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos, como las micorrizas (Plett *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2020), y recientemente fueron descubiertos en las interacciones microbio-microbio (Snelders *et al.*, 2020; Snelders *et al.*, 2021). Con respecto a los fitopatógenos, las funciones de los efectores reflejan su estilo de vida; por ejemplo, los fitopatógenos biotróficos requieren un hospedero vivo para completar su ciclo de infección mientras que los fitopatógenos necrotróficos requieren tejido muerto. Por otro lado, los fitopatógenos hemibiotróficos son una combinación de los dos anteriores, obteniendo su nutrición primero de tejido vivo y al final de su ciclo, de tejido muerto. Mientras que los efectores de los organismos biotróficos a menudo funcionan bloqueando la inmunidad del hospedero, los efectores asociados a necrotrofos encienden las respuestas de defensa del hospedero, pero de una manera descontrolada, intensa y no localizada, in-



**Figure 3.** The biological function of effectors according to the trophic lifestyles of different kinds of phytopathogens. A) In biotrophs, the effectors prevent the hypersensitive response and suppress plant defense, keeping the plant host alive. Examples of biotrophs are the fungi *Ustilago maydis*, *Blumeria graminis* and *Puccinia triticina*. B) Necrotrophs release effectors that induce cell death through necrosis, phagocytosis, etc. Examples of necrotrophs are the fungi *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola*, and the bacterium *Rhizobium radiobacter*. C) Hemibiotrophs have both kinds of effectors; initially they use effectors expressed in the biotrophic stage which prevent cell death by HR; but towards the end of their life cycle, they use necrotrophic-associated effectors that induce the host cell death. Examples of hemibiotrophs are the fungi *Colletotrichum graminicola*, *Cladosporium fulvum*, the oomycete *Phytophthora infestans*, and the bacterium *Pseudomonas syringae*.

**Figura 3.** Funcionalidad biológica de efectores según los hábitos tróficos de los diferentes tipos de fitopatógenos. A) en los biótrofos, los efectores bloquean la respuesta hipersensible y suprimen la respuesta de defensa vegetal. Los efectores biotróficos mantienen vivas las células del hospedero. Ejemplos de organismos biotróficos son los hongos *Ustilago maydis*, *Blumeria graminis* y *Puccinia triticina*. B) los necrótrofos liberan efectores que causan la muerte celular a través de necrosis, fagocitosis, etc. Ejemplos de organismos necrotróficos son los hongos *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola*, y la bacteria *Rhizobium radiobacter*. C) Los hemibiótrofos poseen ambos tipos de efectores. En el inicio de la interacción emplean efectores expresados en la fase biotrófica que evitan la muerte celular por RH; al final de su ciclo de vida, emplean los efectores asociados a la fase necrotrófica, que provocan la muerte de su hospedero. Ejemplos de organismos hemibiótróficos son los hongos *Colletotrichum graminicola*, *Cladosporium fulvum*, el oomiceto, *Phytophthora infestans* y la bacteria *Pseudomonas syringae*.

genus of hemibiotrophic fungi, there are effectors that participate specifically in the stage of biotrophy, whereas others facilitate necrotrophy, inducing cell death (Ono *et al.*, 2020; Tsushima *et al.*, 2021).

The most widely studied effectors are apoplastic (extracellular) and until the last decade, “extracellular” was part of the definition of effectors (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020), since it was believed that all effectors were extracellular. However, intracellular effectors that act in the cytoplasm and organelles have been described in recent times and are gaining ground in effectoromics

duciendo la muerte del hospedero. Los fitopatógenos hemibiótróficos inicialmente producen efectores que suprimen la respuesta inmune y la muerte celular, pero luego, en la fase necrotrófica, secretan efectores que causan la muerte de la célula hospedera (Castillo-Sanmiguel *et al.*, 2022; Jones y Dangl 2006; Thordal-Christensen, 2020; Todd *et al.*, 2022a) (Figura 3). Por ejemplo, en *Botrytis cinerea* el efector BcNEP1 se expresa fuertemente al inicio de la infección, mientras que los efectores BcSSP2 y BcNEP2 se expresan de manera tardía (Zhu *et al.*, 2022). Similarmente, en *Colletotrichum* spp., género

(Sperschneider and Dodds, 2022; Tariqjaveed *et al.*, 2021; Todd *et al.*, 2022b). Apoplastic effectors tend to be small proteins with enzymatic activity that degrade cell walls, or expansins, that relax them; others are protease inhibitors or inhibitors of the recognition of the phytopathogen by the plant (Fabro, 2022; He *et al.*, 2020; Langin *et al.*, 2020), among other functions. Inside the host cells, the intracellular effectors vary in their location and biological functions; most of their targets in the host are proteins with important functions in plant immunity (Thordal-Christensen, 2020). The targets in the host are usually proteases, components of the ubiquitin-proteasome system, proteins involved in transcription, receptors and proteins involved in biosynthesis pathways and signaling mediated by phytohormones that regulate plant defense (Fabro 2022; Han and Kahmann, 2019). Table 1 shows

de hongos hemibiótrofos, hay efectores que participan de manera específica en la etapa de biotrofia, mientras otros facilitan la necrotrofia, induciendo la muerte celular (Ono *et al.*, 2020; Tsushima *et al.*, 2021).

Los efectores ampliamente estudiados son los conocidos como apoplásticos (extracelulares); hasta la última década era parte de la definición de los efectores (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020) pues se creía que todos los efectores eran extracelulares; no obstante, se han descrito efectores intracelulares que actúan en el citoplasma y en los organelos y van ganando terreno en la efectorómica (Sperschneider y Dodds, 2022; Tariqjaveed *et al.*, 2021; Todd *et al.*, 2022b). Los efectores apoplásticos suelen ser proteínas pequeñas con actividad enzimática que degradan la pared celular, o expansinas que la relajan; otros son inhibidores de proteasas o inhi-

**Table 1. Examples of characterized effectors and their functions in the host.**  
**Cuadro 1. Ejemplos de efectores caracterizados y sus funciones en el hospedero.**

| Efector       | Organismo   | Actividad Biológica                                  | Localización de la proteína                 | Rol de virulencia/ Patogenicidad              | Diana vegetal      | Referencia  |
|---------------|---|--|---|---|--------------------|---|
| AVR 2         | <i>Cladosporium fulvum</i>                          | Induce RH; inhibidor de proteasa                     | Apoplasto                                   | Inhibe Rcr3 y otras proteasas                 | <i>Cf-2</i>        | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |
| AVR 4         | <i>C. fulvum</i>                                    | Induce RH; Unión a quitina                           | Apoplasto; célula fúngica, pared de quitina | Protege contra quitinasas                     | <i>Cf-4</i>        | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |
| AVR 9         | <i>C. fulvum</i>                                    | Induce RH; Inhibidor de carboxypeptidasa             | Apoplasto                                   | Desconocido                                   | <i>Cf.9</i>        | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |
| BcSSP2        | <i>Botrytis cinerea</i>                             | Efector citotóxico; Induce muerte celular            | Apoplasto                                   | No esencial para la patogenicidad             | Desconocido        | Zhu <i>et al.</i> , 2022  |
| PaMissP10b    | <i>Pisolithus albus</i>                             | Interactúa con la S-adenosylmetionina Descarboxilasa | Citoplasma                                  | Modifica la ruta de biosíntesis de poliaminas | Desconocido        | Plett <i>et al.</i> , 2020  |
| PWL 1         | <i>Magnaporthe oryzae</i>                           | Proteína hidrofílica rica en glicina                 | Complejo interfacial biotrófico             | Desconocido                                   | Desconocido        | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |
| PWL 2         | <i>M. oryzae</i>                                    | Proteína hidrofílica rica en glicina                 | Citoplasma                                  | Desconocido                                   | Desconocido        | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |
| PWL 3         | <i>M. oryzae</i>                                    | Proteína hidrofílica rica en glicina                 | Probablemente apoplasto                     | No funcional                                  | Desconocido        | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup>  |
| AVR 3 (SIX 1) | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | Desconocido  | Xilema                                      | Requerido para la total virulencia            | <i>I-3</i>         | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |
| AVR 4 (SIX2)  | <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>       | Desconocido  | Xilema                                      | Requerido para la total virulencia            | <i>Desconocido</i> | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |

Table 1. Continue  
Cuadro 1. Continúa

| Efector          | Organismo  | Actividad Biológica   | Localización de la proteína | Rol de virulencia/ Patogenicidad   | Diana vegetal  | Referencia  |
|------------------|--|---|-----------------------------|--|--|---|
| MfAVR4           | <i>Pseudocercospora fijiensis</i>                      | Peritrofina-A con unión a quitina, inducción de RH  | Probablemente apoplasto     | Protección del hongo contra quitinasas   | <i>Cf-4</i> y <i>Hcr9</i>  | Ali y Bakkeren 2011 <sup>y</sup><br>Selin <i>et al.</i> , 2016 <sup>z</sup> |
| RxLR30           | <i>Phytophthora brassicae</i>                          | Efector de la familia RXLR  | Probablemente apoplasto     | Inhibe la secreción de antimicrobianos mediado por vesículas   | <i>RABA GTPase</i>   | Tomczynska <i>et al.</i> , 2018   |
| MoCDIP6          | <i>M. oryzae</i>                                       | Induce Muerte Celular   | No reportado                | Induce necrosis en hojas   | Relacionados con Patogénesis (PR):<br><i>OsCHT1</i> , <i>OsCHT3</i> ,<br><i>OsNac4</i> , <i>OsPR1B</i> | Guo <i>et al.</i> , 2019  |
| PstCEP1          | <i>Puccinia striiformis</i>                            | Induce HR / muerte celular programada   | Citoplasma                  | Responde a altas temperaturas  | <i>Desconocido</i>   | Tao <i>et al.</i> , 2020  |
| PTTG08198 (CFEM) | <i>P. triticina</i>                                    | Aumenta muerte celular  | No reportado                | Promueve acumulación de ROS  | <i>Desconocido</i>   | Zhao <i>et al.</i> , 2020   |
| BLN08            | <i>Bremia lactucae</i>                                 | Efector de la familia WY  | Mitocondria                 | Induce muerte celular en lechuga   | <i>Desconocido</i>   | Wood <i>et al.</i> , 2020   |
| VdAMP3           | <i>Verticillium dahliae</i>                            | Suprime la respuesta inmune / Induce necrosis y senescencia                                     | Xilema                      | Manipulación del microbioma  | <i>Desconocido</i>   | Snelders <i>et al.</i> , 2021   |
| XopL             | <i>Xanthomonas oryzae</i>                              | Contrarresta la autofagia en el hospedero   | Citoplasma                  | Se une y degrada al componente SH3P2 de la vía de autofagia  | SH3P2  | Leong <i>et al.</i> , 2022  |
| MeTCTP           | <i>Meloidogyne enterolobii</i>                         | Suprime la inmunidad vegetal  | Citoplasma                  | Se une al calico e impide su aumento en el citosol   | Unión directa al calcio  | Guo <i>et al.</i> , 2022  |
| MiMSP32          | <i>M. incognita</i>                                    | Interactúa con una enzima involucrada en la síntesis de jasmonato; suprime la inmunidad vegetal | Citoplasma                  | Promueve la susceptibilidad, contribuye a la virulencia  | 12-oxofitodienoato reductasa 2 (OPR2)  | Verhoeven <i>et al.</i> , 2022  |
| Al6              | <i>Apolygus lucorum</i>                                | Suprime la inmunidad vegetal y permite que el insecto se alimente                               | Apoplasto, citoplasma       | Usa la glutatión peroxidasa para evitar acumulación de especies reactivas de oxígeno   | Glutatión peroxidasa   | Dong <i>et al.</i> , 2023   |
| βC1              | <i>Virus del rizado amarillo de la hoja del tomate</i> | Reduce la actividad de terpeno sintasa.   | Núcleo                      | Disminuye producción de volátiles, provoca mayor atracción a la planta del insecto <i>Bemisia tabaci</i> y mejora el desempeño de éste | PIF y MYC2   | Ray y Casteel, 2022   |

<sup>y,z</sup> review / trabajo de revisión.

some examples of characterized effectors. The reader may expand this catalogue of effectors by consulting the revisions by Kanja and Hammond-Kosack (2020), Todd *et al.*, (2022a, 2022b) and

bidores del reconocimiento del fitopatógeno por la planta (Fabro, 2022; He *et al.*, 2020; Langin *et al.*, 2020), entre otras funciones. Dentro de las células hospederas, los efectores intracelulares varían en

Zhang and collaborators (2022), among others.

Through their effectors, microorganisms can manipulate the synthesis of the phytohormones: jasmonate (JA), salicylate (SA) and ethylene (ET) to their benefit (Alhoraibi *et al.*, 2019; Chini *et al.*, 2018; Langin *et al.*, 2020). For example, the effector Cmu of the fungus *Erysiphe quercicola* chorismate mutase activity, an enzyme that inhibits the synthesis of salicylic acid in the host (He *et al.*, 2021). The effector VdIsc1, of *Verticillium dahliae*, isochorismatase activity, which also interferes in the synthesis of salicylic acid (Zhu *et al.*, 2017), whereas the effector RipAB, of *Ralstonia solanacearum*, interferes with the signaling regulated by salicylic acid (Qi *et al.*, 2022). These examples highlight the importance of inhibiting the synthesis of this phytohormone, which participates in signaling and the defense of the plant. In the mycorrhiza *Laccaria bicolor*, the effector MiSSP7 interacts with the repressor proteins PtJAZ5 and PtJAZ6 of the jasmonic acid signaling pathway, preventing the degradation of these repressor proteins, thus blocking the transcription of defense genes regulated by jasmonic acid, which helps establish a mutualism between the mycorrhiza and the host (Plett *et al.*, 2014). Other effectors affect the physiology of the host to create an ideal environment for colonization; the effector AvrE, from *Pseudomonas syringae* regulates the levels of abscisic acid in the cells to induce stomatal closure, thus increasing water levels in the plant tissue (Hu *et al.*, 2022).

Microorganisms also secrete effectors that promote the synthesis or mimic phytohormones. For example, the necrotic phytopathogen *Lasioidiplodia mediterranea* produces an analog of jasmonic acid, the ester lasiojasmonate A (LasA). LasA can be converted to jasmonyl-isoleucine (JA-Ile), a powerful activator of jasmonic acid signaling and inducer of cell death, facilitating the

localización y funciones biológicas; la mayoría de sus dianas en el hospedero son proteínas con funciones importantes en la inmunidad vegetal (Thordal-Christensen, 2020). Las dianas en el hospedero suelen ser proteasas, componentes del sistema ubiquitina-proteasoma, proteínas involucradas en la transcripción, receptores y las proteínas de las vías de biosíntesis y señalización de los fitohormonas que regulan la defensa vegetal (Fabro 2022; Han y Kahmann, 2019). El Cuadro 1, presenta algunos ejemplos de efectores caracterizados. El lector puede ampliar el catálogo de efectores en las revisiones de Kanja y Hammond-Kosack, (2020), Todd *et al.*, (2022a, 2022b) y Zhang y colaboradores (2022), entre otros.

A través de sus efectores, los microorganismos suelen manipular en su beneficio la síntesis de los fitohormonas jasmonato (JA), salicilato (SA) y etileno (ET) (Alhoraibi *et al.*, 2019; Chini *et al.*, 2018; Langin *et al.*, 2020). Por ejemplo, el effector Cmu del hongo *Erysiphe quercicola* tiene actividad de corismato mutasa, enzima que inhibe la síntesis del ácido salicílico en el hospedero (He *et al.*, 2021). El effector VdIsc1, de *Verticillium dahliae* tiene actividad de isocorismatasa que también interfiere en la síntesis del ácido salicílico (Zhu *et al.*, 2017), mientras el effector RipAB de *Ralstonia solanacearum* interfiere con la señalización regulada por el ácido salicílico (Qi *et al.*, 2022). Estos ejemplos destacan la importancia de inhibir la síntesis de este fitohormona, el cual participa en la señalización y en la defensa vegetal. En la micorriza *Laccaria bicolor*, el effector MiSSP7 interactúa con las proteínas represoras PtJAZ5 y PtJAZ6 de la ruta de señalización del ácido jasmónico, evitando la degradación de estas proteínas represoras y en consecuencia evita la transcripción de genes de defensa regulados por el ácido jasmónico, lo que permite que se establezca el mutualismo entre la micorriza y el hospedero (Plett *et al.*, 2014). Otros



necrotrophy phase of this pathogen (Chini *et al.*, 2018).

### Perspectives of effectoromics in agriculture

The interest in effectoromics and its importance in agrobiotechnology have grown considerably in the last decade, and it is currently a priority area of investigations surrounding phytopathogen-host interactions. Some reports have shown that some effectors may, in the future, be used as bioproducts to induce plant defense responses. For example, the effector MSP1 of the hemibiotrophic fungus *Magnaporthe oryzae* was expressed in the bacteria *Escherichia coli* and when 0.1 μM of the recombinant protein was applied on rice seedling leaves, the plant's defense response was boosted and infection was avoided (Wang *et al.*, 2016). Recently, the effectors MoCDIP6 and MoCDIP7 were reported in this same fungus; following a similar process, the treated plants displayed no symptoms of necrosis or wilting, and they began to express genes related to resistance. When a virulent strain of *M. oryzae* was inoculated, plants developed less and smaller lesions in comparison with the control plants (Guo *et al.*, 2019). In *Fusarium oxysporum* in interaction with tobacco plants, the effector FocCPI induced the expression of genes related to salicylic acid signaling. When FocCPI was applied on tobacco plants followed by inoculation with the tobacco mosaic virus, the treated plants developed less symptoms than the control (Li *et al.*, 2019). This is a promising line of investigation, since it offers an eco-friendly approach to disease control in comparison with commercial pesticides, although there are currently few investigations that aim to explore the agrobiotechnological use of effectors. The majority of investigations focus on elemental aspects such as their structure, function or cell location.

efectores afectan la fisiología del hospedero para crear un ambiente propicio para la colonización; el efector AvrE de *Pseudomonas syringae* regula los niveles del ácido abscísico en las células para inducir el cierre estomático y así aumentar los niveles de agua en el tejido vegetal (Hu *et al.*, 2022).

En otras ocasiones, los microorganismos secretan efectores que promueven la síntesis o mimetizan a los fitorreguladores. Por ejemplo, el fitopatógeno necrotrófico *Lasiodiplodia mediterranea* produce un análogo del ácido jasmónico, el éster lasiojasmonato A (LasA). LasA se puede convertir en jasmonil-isoleucina (JA-Ile), un potente activador de la señalización del ácido jasmónico e inductor de la muerte celular, facilitando la necrotrofia de este patógeno (Chini *et al.*, 2018).

### Perspectivas de la efectorómica en la agricultura

El interés en la efectorómica y su importancia en la agrobiotecnología ha crecido de manera importante en la última década, y actualmente es un área prioritaria en las investigaciones de las interacciones fitopatógeno-hospedero. Algunos reportes han mostrado que algunos efectores pudieran en el futuro ser utilizados como bioproductos por sí mismos, para inducir respuestas de defensa vegetal. Por ejemplo, el efector MSP1 del hongo hemibiótrofo *Magnaporthe oryzae* se expresó de manera heteróloga en la bacteria *Escherichia coli* y se aplicó 0.1 μM de la proteína recombinante en las hojas de plántulas de arroz, lo que potenció la respuesta de defensa y evitó su infección (Wang *et al.*, 2016). Recientemente, de este mismo hongo, se reportaron los efectores MoCDIP6 y MoCDIP7; siguiendo un proceso similar, se observó que las plantas tratadas no mostraron síntomas de necrosis o marchitez, y comenzaron a expresar genes relacionados a la resistencia; cuando se inoculó una cepa virulenta de *M. oryzae*, las plantas desarrollaron menos

Vleeshouwers and collaborators (2011) pioneered the use of effectors in potato crops for the selection of resistant germplasm in genetic breeding programs. *Phytophthora infestans* effectors have been used to select potato germplasm, in which resistance genes were identified that were useful in the development of improved varieties. Nowadays, introducing resistance genes into susceptible germplasm is one of the most promising applications in genetic breeding programs (Chen *et al.*, 2022; Ji *et al.*, 2022; Ochola *et al.*, 2020). Recombinant effector proteins have also been used to identify susceptible plants. The hypothesis is that when susceptibility genes are mutated, plants will have a more durable resistance in comparison with that mediated by resistance genes (R) (Campos *et al.*, 2021; Garcia-Ruiz *et al.*, 2021; Koseoglou *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2022).

Due to the lack of effector conservation, the development of effectoromics has been slow and difficult. However, with the progress made in high throughput analyses, effectoromics is currently under development and has lots to offer agriculture (Li *et al.*, 2021; Van de Wouw and Idnurm, 2019). Consequently, it is necessary to have robust prediction methods, as well as large-scale effector characterization protocols that help identify effectors with crucial functions to infections and that can protect the plant, at least against the phytopathogen that produces it, or preferably protect the plant against several phytopathogens at a time.

### Current landscape of effectoromics in Mexico

Effectoromics is an emerging field in Mexico. The first investigations in which Mexican scientists participated focused on the identification of effectors in the oomycetes *P. infestans* during the infection of tomato and *Phytophthora capsici* in

lesiones y más pequeñas en comparación con las plantas control (Guo *et al.*, 2019). En *Fusarium oxysporum*, en interacción con la planta de tabaco, el efector FocCP1 indujo la expresión de genes relacionados con la señalización por ácido salicílico. Cuando se aplicó FocCP1 en plantas de tabaco y se inoculó con el virus del mosaico del tabaco, las plantas tratadas desarrollaron menos síntomas que en el control (Li *et al.*, 2019). Esta es una prometedora línea de investigación, ya que ofrece una perspectiva eco-amigable en comparación a los pesticidas comerciales, pero actualmente hay pocos trabajos dirigidos a explorar el aprovechamiento agrobiotecnológico de los efectores. La inmensa mayoría de los trabajos se enfocan a aspectos básicos de su estructura, función o localización celular.

En otra línea de aplicación, Vleeshouwers y colaboradores (2011) impulsaron el uso de los efectores para seleccionar germoplasma resistente para programas de mejoramiento genético. Se han empleado efectores de *Phytophthora infestans* para seleccionar plantas de papa, donde se identificaron un conjunto de genes de resistencia que fueron útiles para desarrollar variedades mejoradas. Hoy en día, introducir genes de resistencia en germoplasma susceptible, es una de las aplicaciones más promisorias en programas de mejoramiento genético (Chen *et al.*, 2022; Ji *et al.*, 2022; Ochola *et al.*, 2020). También se han usado proteínas efectoras recombinantes para la identificación de plantas susceptibles. Se hipotetiza que, al mutar los genes de susceptibilidad, las plantas tendrán resistencia más duradera en comparación con la resistencia mediada por genes de resistencia (R) (Campos *et al.*, 2021; Garcia-Ruiz *et al.*, 2021; Koseoglou *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2022).

Debido a la falta de conservación de los efectores, el desarrollo de la efectorómica ha sido lenta y difícil; sin embargo, con los avances en análisis masivos, actualmente la efectorómica está en pleno

a non-host interaction in *Nicotiana* spp. (Zuluaga *et al.*, 2015; Vega-Arreguín *et al.*, 2017). These investigations identified a diversity of effectors, including IpiO and SNE1 during the biotrophic phase of infection, as well as PiNPP1.1 during the necrotrophic phase. The RXLR, CRN and NPP effector families, common in oomycetes, were also identified (Zuluaga *et al.*, 2015). In turn, the *Nicotiana* species displayed resistance against *P. capsici*. The analysis identified that resistance is mediated by the gene *I2R*, which recognizes the protein effector PcAvr3a1 in the phytopathogen (Vega-Arreguín *et al.*, 2017).

In phytopathogenic fungi, the identification of effectors in *P. fijiensis*, the fungus that causes black Sigatoka in banana and plantains, is being addressed. Initial analysis identified 136 canonical effectors, that is, they display all the classic characteristics of effectors (secreted, small size, high cysteine content) (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020). In order to contribute to world fungal effectoromics, Carreón-Anguiano *et al.* (2022) created an algorithm, WideEffHunter, which can identify non-canonical effectors, and found that the canonical effectors compose approximately 10% of the effectoromes of fungi and oomycetes. The identification of global effectoromes is expected to help identify new effector families, a greater number of effectors that share homology in different organisms, and new motifs and domains in protein effectors (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Todd *et al.*, 2022b).

Other Mexican investigations have focused on non-phytopathogenic organisms. Guzmán-Guzmán *et al.* (2017) bioinformatically identified 233 effectors in *Trichoderma virens*, *T. atroviride* and *T. reesei* proteomes, where 16 effectors from *T. virens* and *T. atroviride* were selected for characterization. They found that some effectors are expressed during fungal colonization of *A. thaliana*,

desarrollo y tiene mucho que ofrecer a la agricultura (Li *et al.*, 2021; Van de Wouw y Idnurm, 2019). En consecuencia, es necesario contar con métodos robustos de predicción, así como protocolos de caracterización masiva de efectores, que permitan identificar efectores con funciones indispensables en la infección y que sean capaces de conferir protección a la planta al menos contra el fitopatógeno que lo produce, o preferentemente protegerla contra múltiples fitopatógenos a la vez.

### Panorama actual de la efectorómica en México

La efectorómica es un campo de desarrollo incipiente en México. Los primeros trabajos en los que participaron investigadores mexicanos se enfocaron a la identificación de efectores de los oomicetos *P. infestans* durante la infección de jitomate y de *Phytophthora capsici* en interacción de tipo no-hospedera en *Nicotiana* spp. (Zuluaga *et al.*, 2015; Vega-Arreguín *et al.*, 2017). En estos trabajos identificaron diversidad de efectores, entre ellos, encontraron a los efectores IpiO y SNE1 durante la fase biotrófica, y a PiNPP1.1 durante la fase necrotrofica. Las familias de efectores RXLR, CRN, y NPP, comunes en oomicetos, fueron identificadas también (Zuluaga *et al.*, 2015). Por su parte, las especies de *Nicotiana* mostraron resistencia contra *P. capsici*. El análisis identificó que la resistencia es mediada por el gen *I2R* que reconoce en el fitopatógeno al efector proteico PcAvr3a1 (Vega-Arreguín *et al.*, 2017).

En hongos fitopatógenos, se está abordando la identificación de efectores en *P. fijiensis*, el hongo causante de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. En ese primer análisis se identificaron 136 efectores canónicos, es decir, que cumplen con todas las características clásicas de los efectores (secretados, pequeño tamaño, alto contenido de cisteínas) (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020). Con el

whereas others are expressed when they confront the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Among the *Trichoderma* effectors, hydrolases have been found along with hydrophobins, cerato-platanins, and effectors with CFEM or LysM domains (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019; Romero-Contreras *et al.*, 2019). Interestingly, a class II hydrophobin, tvhydii1, is overexpressed in *T. virens* in the presence of the phytopathogen *R. solani*; the mutants that lose their tvhydii1 function lose part of their ability to colonize plant roots, whereas its overexpression increases colonization (Guzmán *et al.*, 2017).

Recently, Báez-Astorga *et al.* (2022) reported the action mechanism of the biocontrol agent *Bacillus cereus*, which is able to inhibit *in vitro* *Fusarium verticillioides*, a phytopathogen that causes ear and root rot in maize. *F. verticillioides* secretes the effector Fv-cmp which has protease activity and digests types A and B chitinases of the plant. On the other hand, *B. cereus* secretes the effectors ChiA and ChiB with chitinase activity which, *in vitro*, act upon the *F. verticillioides* conidia and prevent them from germinating and developing into hyphae. This is due, in particular, to effector ChiB with the domain CBM 2, which helps it adhere strongly to the fungal cell wall, displaying greater activity than ChiA.

Although there are very few investigations in Mexico in the area of effectoromics, these investigations show promising results in the realm of biotechnological applications. Research on effectors in Mexico may expand to study phytopathogenic bacteria, as well as insect pests and nematodes. It is worth mentioning that the interest in these areas has grown in recent years worldwide, but the number of investigation groups is still limited, thus representing an opportunity for Mexican research to contribute to this niche in effectoromics.

objetivo de contribuir a la efectorómica fúngica en el mundo, Carreón-Anguiano *et al.* (2022) crearon un algoritmo, WideEffHunter, que es capaz de identificar efectores no-canónicos, encontrando que los efectores canónicos comprenden aproximadamente 10% de los efectoromas en hongos y en oomicetos. Se espera que la identificación de efectoromas globales permita identificar nuevas familias de efectores, mayor número de efectores que en diferentes organismos comparten homología, y nuevos motivos y dominios en los efectores proteicos (Carreón-Anguiano *et al.*, 2022; Todd *et al.*, 2022b).

Otros trabajos mexicanos se han enfocado en organismos no fitopatógenos. Guzmán-Guzmán *et al.* (2017) identificaron bioinformáticamente 233 efectores al unir los proteomas de *Trichoderma virens*, *T. atroviride* y *T. reesei*, donde seleccionaron 16 efectores de *T. virens* y *T. atroviride* y los caracterizaron, encontrando que unos se expresan cuando estos hongos colonizan *A. thaliana*, mientras otros se expresan cuando se enfrentan al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Entre los efectores de *Trichoderma* se han encontrado hidrolasas, hidrofobinas, cerato-plataninas, y efectores con dominios CFEM, o dominios LysM (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019; Romero-Contreras *et al.*, 2019). Interesantemente, una hidrofobina de clase II, tvhydii1, se sobre-expresa en *T. virens* en presencia del fitopatógeno *R. solani*; las mutantes que pierden la función de tvhydii1 pierden parte de su capacidad de colonizar las raíces de las plantas, mientras que su sobre-expresión la incrementa (Guzmán *et al.*, 2017).

Recientemente, Báez-Astorga *et al.* (2022) reportaron el mecanismo de acción del agente de biocontrol *Bacillus cereus*, que es capaz de inhibir *in vitro* a *Fusarium verticillioides*, un fitopatógeno que causa pudrición de la mazorca y las raíces del maíz. *F. verticillioides* secreta el effector Fv-cmp con ac-

## CONCLUSIONS

Effectors are extremely important for the establishment of biological interactions; within the range of interactions in which they are found, the plant-pathogen interaction is the most studied. The first study was in the *L. usitatissimum*-*M. lini* interaction in the 1940s, and although currently there are great advances in effectoromics, knowledge is still limited. Consequently, it has become necessary to expedite the prioritization of effectors for their characterization, since hundreds of them are identified for each organism during *in silico* analysis.

The identification and characterization of effectors crucial to phytopathogen virulence could be key to the development of new methods to manage diseases in agriculture, based on effectors. The identification of target proteins in the host is incipient; among these target proteins, there are possible resistance proteins with genes that can be used for plant protection. Undoubtedly, the effectors of microorganisms represent opportunity niches that must be understood in order to use them for the benefit of society and world food security.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the National Science and Technology Council (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT-México), with Project FOP16-2021-01 No. 320993, and scholarships No. 291236 by JNA Todd, No. 644399 by OJ Couoh-Dzul and No. 700673 by KGCA.

## LITERATURE CITED

Alhoraibi H, Bigeard J, Rayapuram N, Colcombet J and Hirt H. 2019. Plant Immunity: The MTI-ETI Model and Beyond. *Current issues in molecular biology* 30: 39–58. <https://doi.org/10.21775/cimb.030.039>

tividad de proteasa que digiere las quitinasas tipo A y B de la planta. Por su parte, *B. cereus* secreta los efectores ChiAy ChiB con actividad quitinasa que *in vitro* actúan sobre los conidios de *F. verticillioides* e impiden que germinen y se desarrollen en hifas, particularmente ChiB que posee el dominio CBM 2, el cual le permite unirse con más fuerza a la pared del hongo y tener mayor actividad que ChiA. Aunque aún son muy pocos los trabajos desarrollados en México en el área de la efectorómica, estas investigaciones muestran resultados prometedores en cuanto a aplicaciones biotecnológicas. Es deseable que en México se impulse también el estudio de los efectores en las bacterias fitopatógenas, e insectos y nematodos plagas. Cabe mencionar que el interés en estas áreas ha crecido en los últimos años a nivel mundial, pero el número de grupos de investigación aún es limitado por lo que representa un nicho de oportunidad para contribuir con investigaciones mexicanas.

## CONCLUSIONES

Los efectores son sumamente importantes para el establecimiento de interacciones biológicas; dentro del rango de interacciones en que se encuentran, la interacción planta-patógeno es la más estudiada. El primer acercamiento hacia los efectores fue en la interacción *L. usitatissimum*-*M. lini* en los años 40 y aunque en la actualidad se tiene grandes avances en la efectorómica, el conocimiento es aún limitado. En consecuencia, es necesario agilizar la priorización de efectores para su caracterización pues se identifican cientos de ellos para cada organismo durante el análisis *in silico*.

La identificación y caracterización de los efectores indispensables para la virulencia de los fitopatógenos podría ser clave para el desarrollo de nuevos métodos de manejo de enfermedades en

- Ali S and Bakkeren, G. 2011. Fungal and oomycete effectors – strategies to subdue a host. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33(4): 425–446. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.625448>
- Almeida F, Rodrigues ML and Coelho C. 2019. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Frontiers in Microbiology* 10: 214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>
- Báez-Astorga PA, Cázares-Álvarez JE, Cruz-Mendivil A, Quiroz-Figueroa FR, Sánchez-Valle VI and Maldonado-Mendoza IM. 2022. Molecular and biochemical characterisation of antagonistic mechanisms of the biocontrol agent *Bacillus cereus* B25 inhibiting the growth of the phytopathogen *Fusarium verticillioides* P03 during their direct interaction in vitro, *Biocontrol Science and Technology* 32(9): 1074–1094. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2085662>
- Baker BP, Green TA and Loker AJ. 2020. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biological Control* 140: 104095. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095>
- Cai J, Jiang Y, Ritchie ES, Macho AP, Yu F and Wu D. 2023. Manipulation of plant metabolism by pathogen effectors: More than just food. *FEMS Microbiology Reviews* fuad007. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad007>
- Camborde L, Kiselev A, Pel MJC, Le Ru A, Jauneau A, Pouzet C, Dumas B and Gaulin E. 2022. An oomycete effector targets a plant RNA helicase involved in root development and defense. *New Phytologist* 233(5): 2232–2248. <https://doi.org/10.1111/nph.17918>
- Campos MD, Félix MDR, Patanita M, Materatski P and Varanda C. 2021. High throughput sequencing unravels tomato-pathogen interactions towards a sustainable plant breeding. *Horticulture Research* 8(1): 171. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00607-x>
- Carreón-Anguiano KG, Todd JNA, Chi-Manzanero BH, Couoh-Dzul OJ, Islas-Flores I, and Canto-Canché B. 2022. WideEffHunter: An Algorithm to Predict Canonical and Non-Canonical Effectors in Fungi and Oomycetes. *International journal of molecular sciences* 23(21): 13567. <https://doi.org/10.3390/ijms232113567>
- Carreón-Anguiano KG, Islas-Flores I, Vega-Arreguín J, Sáenz-Carbonell L and Canto-Canché B. 2020. EffHunter: A Tool for Prediction of Effector Protein Candidates in Fungal Proteomic Databases. *Biomolecules* 10(5): 712. <https://doi.org/10.3390/biom10050712>
- Castillo-Sanmiguel PA, Cortés-Sánchez LR and Acero-Godoy J. 2022. Molecular aspects of tomato (*Solanum lycopersicum*) vascular wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and antagonism by *Trichoderma* spp. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(1): 82–102. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-1>
- Chang M, Chen H, Liu F and Fu ZQ. 2022. PTI and ETI: Convergent pathways with diverse elicitors. *Trends in Plant Science* 27(2): 113–115. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.013>

la agricultura, basado en los efectores. La identificación de las proteínas dianas en el hospedero se encuentra rezagada; dentro de estas dianas hay posibles proteínas de resistencia cuyos genes pueden ser utilizados para la protección vegetal. Indudablemente, los efectores de los microorganismos representan nichos de oportunidad que se requieren comprender para poder aprovecharlos para el bien de la población y la seguridad alimentaria mundial.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACyT-México), con el Proyecto FOP16-2021-01 No. 320993, y las becas No. 291236 de JNA Todd, No. 644399 de OJ Couoh-Dzul y No. 700673 de KGCA.

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

- Chen CY, Liu YQ, Song WM, Chen DY, Chen FY, Chen XY, Chen ZW, Ge SX, Wang CZ, Zhan S, Chen XY and Mao YB. 2019. An effector from cotton bollworm oral secretion impairs host plant defense signaling. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 116(28): 14331–14338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905471116>
- Chen L, Wang H, Yang J, Yang X, Zhang M, Zhao Z, Fan Y, Wang C and Wang J. 2021. Bioinformatics and Transcriptome Analysis of CFEM Proteins in *Fusarium graminearum*. *Journal of Fungi* 7(10): 871. <https://doi.org/10.3390/jof7100871>
- Chini, A., Cimmino, A., Masi, M., Reveglia, P., Nocera, P., Solano, R., & Evidente, A. (2018). The fungal phytotoxin lasiojasmonate A activates the plant jasmonic acid pathway. *Journal of experimental botany* 69(12): 3095–3102. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery114>
- Dong Y, Zhang W, Jin Y, Shen D and Xia A. 2023. *Apolycus lucorum* effector Al6 promotes insect feeding performance on soybean plants: RNAi analysis and feeding behaviour study with electrical penetration graph. *Insect molecular biology*, 32(1): 1–10. <https://doi.org/10.1111/imb.12808>
- Fabro G. 2022. Oomycete intracellular effectors: specialised weapons targeting strategic plant processes. *The New Phytologist* 233(3): 1074–1082. <https://doi.org/10.1111/nph.17828>

- FAO, 2017. The future of food and agriculture – trends and challenges. Recuperado en 12 de marzo de 2023, de <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>
- Figueroa M, Ortiz D and Henningsen EC. 2021. Tactics of host manipulation by intracellular effectors from plant pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 62: 102054. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102054>
- Flor HH. 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653–669
- García-Ruiz H, Szurek B and Van den Ackerveken G. 2021. Stop helping pathogens: engineering plant susceptibility genes for durable resistance. *Current Opinion in Biotechnology* 70: 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.05.005>
- Ghislain M, Byarugaba AA, Magembe E, Njoroge A, Rivera C, Román ML, Tovar JC, Gamboa S, Forbes GA, Kreuzer JF, Barekye A and Kiggundu A. 2019. Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnology Journal* 17(6): 1119–1129. <https://doi.org/10.1111/pbi.13042>
- Guo B, Lin B, Huang Q, Li Z, Zhuo K and Liao J. 2022. A nematode effector inhibits plant immunity by preventing cytosolic free Ca<sup>2+</sup> rise. *Plant Cell Environment* 45 (10): 3070-3085. <https://doi.org/10.1111/pce.14406>
- Guo X, Zhong D, Xie W, He Y, Zheng Y, Lin Y, Chen Z, Han Y, Tian D, Liu W, Wang F, Wang Z and Chen S. 2019. Functional identification of novel cell death-inducing effector proteins from *Magnaporthe oryzae*. *Rice* 12(1): 59. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0312-z>
- Gupta A, Singh UB, Sahu PK, Paul S, Kumar A, Malviya D, Singh S, Kuppusamy P, Singh P, Paul D, Rai JP, Singh HV, Manna MC, Crusberg TC, Kumar, A and Saxena AK. 2022. Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(5): 3141. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053141>
- Guzmán-Guzmán P, Porras-Troncoso MD, Olmedo-Monfil V and Herrera-Estrella A. 2019. Trichoderma Species: Versatile Plant Symbionts. *Phytopathology* 109(1): 6–16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Han X and Kahmann R. 2019. Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Frontiers in Plant Science* 10: 822. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00822>
- He Q, Liu Y, Liang P, Liao X, Li X, Li X, Shi D, Liu W, Lin C, Zheng F and Miao W. 2021. A novel chorismate mutase from *Erysiphe quercicola* performs dual functions of synthesizing amino acids and inhibiting plant salicylic acid synthesis. *Microbiological Research* 242: 126599. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126599>
- He Q, McLellan H, Boevink PC and Birch P. 2020. All roads lead to susceptibility: the many modes of action of fungal and oomycete intracellular effectors. *Plant communications* 1(4): 100050. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100050>
- Hu Y, Ding Y, Cai B, Qin X, Wu J, Yuan M, Wan S, Zhao Y and Xin XF. 2022. Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast. *Cell Host & Microbe* 30(4): 518-529.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.02.002>
- Huang C. 2021. From Player to Pawn: Viral Avirulence Factors Involved in Plant Immunity. *Viruses* 13(4): 688. <https://doi.org/10.3390/v13040688>
- Huang Z, Li H, Zhou Y, Bao Y, Duan Z, Wang C, Powell CA., Chen B, Zhang M and Yao W. 2022. Predication of the Effector Proteins Secreted by *Fusarium sacchari* Using Genomic Analysis and Heterogenous Expression. *Journal of Fungi* 8(1): 59. <https://doi.org/10.3390/jof8010059>
- Hurlburt NK, Chen LH, Stergiopoulos I and Fisher AJ. 2018. Structure of the *Cladosporium fulvum* Avr4 effector in complex with (GlcNAc)<sub>6</sub> reveals the ligand-binding mechanism and uncouples its intrinsic function from recognition by the Cf-4 resistance protein. *PLoS Pathogens* 14(8):e1007263. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007263>
- Ji Z, Guo W, Chen X, Wang C and Zhao K. 2022. Plant executor genes. *International Journal of Molecular Sciences* 23(3):1524. <https://doi.org/10.3390/ijms23031524>
- Jones JD and Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kang H, Chen X, Kempainen M, Pardo AG, Veneault-Fourrey C, Kohler A and Martin FM. (2020). The small secreted effector protein MiSSP7.6 of *Laccaria bicolor* is required for the establishment of ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology* 22(4): 1435–1446. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14959>
- Kanja C and Hammond-Kosack KE. 2020. Proteinaceous effector discovery and characterization in filamentous plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* 21(10):1353-1376. <https://doi.org/10.1111/mpp.12980>
- Koseoglou E, van der Wolf JM, Visser RGF and Bai Y. 2022. Susceptibility reversed: modified plant susceptibility genes for resistance to bacteria. *Trends in Plant Science* 27(1):69-79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.018>
- Langin G, Gouguet P and Üstün S. 2020. Microbial effector proteins - a journey through the proteolytic landscape. *Trends in Microbiology* 28(7): 523-535. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.010>
- Leong JX, Raffener M, Spinti D, Langin G, Franz-Wachtel M, Guzman AR, Kim JG, Pandey P, Minina AE, Macek B, Hafrén A, Bozkurt TO, Mudgett MB, Börnke F, Hofius D and Üstün S. 2022. A bacterial effector counteracts host autophagy by promoting degradation of an autophagy component. *The EMBO Journal* 41(13):e110352. <https://doi.org/10.15252/embj.2021110352>
- Li Q, Wang B, Yu J and Dou D. 2021. Pathogen-informed breeding for crop disease resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(2): 305–311. <https://doi.org/10.1111/jipb.13029>

- Li S, Dong Y, Li L, Zhang Y, Yang X, Zeng H, Shi M, Pei X, Qiu D and Yuan Q. 2019. The Novel Cerato-Platanin-Like Protein FocCP1 from *Fusarium oxysporum* Triggers an Immune Response in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20(11):2849. <https://doi.org/10.3390/ijms20112849>
- Li W, Deng Y, Ning Y, He Z and Wang GL. 2020. Exploiting Broad-Spectrum Disease Resistance in Crops: From Molecular Dissection to Breeding. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1): 575–603. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-010720-022215>
- Nazarov PA, Baleev DN, Ivanova MI, Sokolova LM and Karakozova MV. (2020). Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection. *Acta Naturae* 12(3): 46–59. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026>
- Noar RD and Daub ME. 2016. Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. *BMC Genomics* 17(1):690. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3031-5>
- Nur M, Wood K and Michelmore R. 2021. EffectorO: motif-independent prediction of effectors in oomycete genomes using machine learning and lineage specificity. Preprint. [bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2021.03.19.436227](https://doi.org/10.1101/2021.03.19.436227)
- Ochola S, Huang J, Ali H, Shu H, Shen D, Qiu M, Wang L, Li X, Chen H, Kange A, Qutob D and Dong S. 2020. Editing of an effector gene promoter sequence impacts plant-*Phytophthora* interaction. *Journal Integrative Plant Biology* 62(3):378-392. <https://doi.org/10.1111/jipb.12883>
- Ono E, Mise K and Takano Y. 2020. RLP23 is required for *Arabidopsis* immunity against the grey mould pathogen *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports* 10(1):13798. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70485-1>
- Outram MA, Solomon PS and Williams SJ. 2021. Pro-domain processing of fungal effector proteins from plant pathogens. *PLoS Pathogen* 17(10):e1010000. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010000>
- Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R and Reveles-Torres LR. 2018. A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 95-114. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-6>
- Peng Z, Oliveira-Garcia E, Lin G, Hu Y, Dalby M, Migeon P, Tang H, Farman M, Cook D, White FF, Valent B and Liu S. 2019. Effector gene reshuffling involves dispensable mini-chromosomes in the wheat blast fungus. *PLoS Genetics* 15(9):e1008272. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008272>
- Plett JM, Plett KL, Wong-Bajracharya J, de Freitas Pereira M, Costa MD, Kohler A, Martin F and Anderson IC. 2020. Mycorrhizal effector PaMiSSP10b alters polyamine biosynthesis in Eucalyptus root cells and promotes root colonization. *New Phytologist* 228(2):712-727. <https://doi.org/10.1111/nph.16759>
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton S J, Kohler A, Morrell-Falvey J L, Brun A, Veneault-Fourrey C and Martin F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(22): 8299–8304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322671111>
- Porras R, Miguel-Rojas C, Pérez-de-Luque A and Sillero JC. 2022. Macro- and Microscopic Characterization of Components of Resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in a Collection of Spanish Bread Wheat Cultivars. *Agronomy* 12(5):1239. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051239>
- Qi P, Huang M, Hu X, Zhang Y, Wang Y, Li P, Chen S, Zhang D, Cao S, Zhu W, Xie J, Cheng J, Fu Y, Jiang D, Yu X and Li B. 2022. A *Ralstonia solanacearum* effector targets TGA transcription factors to subvert salicylic acid signaling. *The Plant Cell* 34(5): 1666–1683. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac015>
- Ramírez-Valdespino CA, Casas-Flores S and Olmedo-Monfil V. 2019. *Trichoderma* as a Model to Study Effector-Like Molecules. *Frontiers in Microbiology* 10:1030. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>
- Rangel LI and Bolton MD. 2022. The unsung roles of microbial secondary metabolite effectors in the plant disease cacophony. *Current Opinion in Plant Biology* 68:102233. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102233>
- Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N, Singh S, Grewal AS, Srivastav A Land Kaushal J. 2021. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production* 283: 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>
- Romero-Contreras YJ, Ramírez-Valdespino CA, Guzmán-Guzmán P, Macías-Segoviano JI, Villagómez-Castro JC and Olmedo-Monfil V. (2019). Tal6 From *Trichoderma atroviride* Is a LysM Effector Involved in Mycoparasitism and Plant Association. *Frontiers in Microbiology* 10: 2231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02231>
- Ray S and Casteel CL. 2022. Effector-mediated plant-virus-vector interactions. *Plant Cell* 34(5):1514-1531. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac058>
- Ribeiro JA, Albuquerque A Materatski P, Patanita M, Varanda CMR, Félix MDR and Campos MD. 2022. Tomato response to *Fusarium* spp. infection under field conditions: study of potential genes involved. *Horticulturae* 8: 433. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050433>
- Ristaino JB, Anderson PK, Beber DP, Brauman KA, Cunniffe NJ, Fedoroff NV, Finegold C, Garrett KA, Gilligan CA, Jones CM, Martin MD, MacDonald GK, Neenan P, Records A, Schmale D G, Tateosian L and Wei Q. 2021. The persistent threat of emerging plant disease pandemics to global food security. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(23): e2022239118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022239118>



- Rocafort M, Fudal I and Mesarich C H. 2020. Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Current Opinion in Plant Biology* 56: 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.004>
- Rufián JS, Rueda-Blanco J, López-Márquez D, Macho AP, Beuzón CR and Ruiz-Albert J. 2021. The bacterial effector HopZ1a acetylates MKK7 to suppress plant immunity. *New Phytologist* 231(3):1138-1156. <https://doi.org/10.1111/nph.17442>
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N and Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 3(3): 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Schreiber KJ, Chau-Ly IJ and Lewis JD. 2021. What the Wild Things Do: Mechanisms of Plant Host Manipulation by Bacterial Type III-Secreted Effector Proteins. *Microorganisms* 9(5): 1029. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051029>
- Selin C, de Kievit TR, Belmonte MF and Fernando WG. 2016. Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. *Frontiers in Microbiology* 7:600. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.0060>
- Snelders NC, Petti GC, van den Berg GCM, Seidl MF and Thomma BPHJ. 2021. An ancient antimicrobial protein co-opted by a fungal plant pathogen for in planta mycobiome manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(49):e2110968118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110968118>
- Snelders NC, Rovenich H, Petti GC, Rocafort M, van den Berg GCM, Vorholt JA, Mesters JR, Seidl MF, Nijland R and Thomma BPHJ. 2020. Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. *Natural Plants* 6(11):1365-1374. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00799-5>
- Snelders NC, Rovenich H and Thomma BPHJ. 2022. Microbiota manipulation through the secretion of effector proteins is fundamental to the wealth of lifestyles in the fungal kingdom. *FEMS Microbiology Reviews* 46(5): fuac022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac022>
- Sperschneider J, Dodds PN, Gardiner DM, Singh KB and Taylor JM. 2018. Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular Plant Pathology* 19(9):2094-2110. <https://doi.org/10.1111/mpp.12682>
- Sperschneider J and Dodds PN. 2022. EffectorP 3.0: prediction of apoplastic and cytoplasmic effectors in fungi and oomycetes. *Molecular plant-microbe interactions* 35(2): 146–156. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-21-0201-R>
- Tang Z, Bernards MA and Wang A. 2022. Simultaneous determination and subcellular localization of protein-protein interactions in plant cells using bimolecular fluorescence complementation assay. *Methods in Molecular Biology* 2400:75-85. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1835-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1835-6_8)
- Tao F, Hu Y, Su C, Li J, Guo L, Xu X, Chen X, Shang H and Hu X. 2020. Revealing differentially expressed genes and identifying effector proteins of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in response to high-temperature seedling plant resistance of wheat based on transcriptome sequencing. *mSphere*. 5(3):e00096-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00096-20>
- Tariqjaveed M, Mateen A, Wang S, Qiu S, Zheng X, Zhang J, Bhaduria V and Sun W. 2021. Versatile effectors of phytopathogenic fungi target host immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(11): 1856–1873. <https://doi.org/10.1111/jipb.13162>
- Thakur N, Kaur S, Tomar P, Thakur S and Yadav AN. 2020. Chapter 15 - Microbial biopesticides: Current status and advancement for sustainable agriculture and environment. In A. A. Rastegari, A. N. Yadav, & N. Yadav (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 243–282). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820526-6.00016-6>
- Thordal-Christensen H. A 2020. Holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cell Molecular Life Science* 77(20): 3963-3976. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03515-w>
- Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Islas-Flores I and Canto-Canché B. (2022a). Microbial Effectors: Key Determinants in Plant Health and Disease. *Microorganisms* 10(10): 1980. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101980>
- Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Islas-Flores I and Canto-Canché B. (2022b). Fungal Effectoromics: A World in Constant Evolution. *International journal of molecular sciences* 23(21): 13433. <https://doi.org/10.3390/ijms232113433>
- Tomczynska I, Stumpe M and Mauch F. 2018. A conserved RxLR effector interacts with host RABA-type GTPases to inhibit vesicle-mediated secretion of antimicrobial proteins. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 95(2):187-203. <https://doi.org/10.1111/tpj.13928>
- Toruño TY, Stergiopoulos I and Coaker G. 2016. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review in Phytopathology* 54: 419-41. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
- Tsushima A, Narusaka M, Gan P, Kumakura N, Hiroshima R, Kato N, Takahashi S, Takano Y, Narusaka Y and Shirasu K. 2021. The Conserved *Colletotrichum* spp. Effector Candidate CEC3 Induces Nuclear Expansion and Cell Death in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 12: 682155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682155>
- van der Sluijs JP. 2020. Insect decline, an emerging global environmental risk. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 46: 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2020.08.012>
- Van de Wouw AP and Idnurm A. 2019. Biotechnological potential of engineering pathogen effector proteins for use in plant disease management. *Biotechnology Advances*, 37(6): 107387. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.009>

- Vega-Arreguín JC, Shimada-Beltrán H, Sevillano-Serrano J and Moffett P. 2017. Non-host Plant Resistance against *Phytophthora capsici* Is Mediated in Part by Members of the I2 R Gene Family in *Nicotiana* spp. *Frontiers in plant science* 8: 205. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00205>
- Velásquez AC, Castroverde CDM and He SY. 2018. Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology* 28(10): R619–R634. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.054>
- Verhoeven A, Finkers-Tomczak A, Prins P, Valkenburg-van Raaij DR, van Schaik CC, Overmars H, van Steenbrugge JJM, Tacke W, Varossieau K, Slootweg EJ, Kappers IF, Quentin M, Govere A, Sterken MG and Smant G. 2023. The root-knot nematode effector MiMSP32 targets host 12-oxophytodienoate reductase 2 to regulate plant susceptibility. *New Phytologist* 237(6), 2360–2374. <https://doi.org/10.1111/nph.18653>
- Vieira P and Gleason C. 2019. Plant-parasitic nematode effectors - insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology* 50:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.007>
- Vleeshouwers VG, Raffaele S, Vossen JH, Champouret N, Oliva R, Segretin ME, Rietman H, Cano LM, Lokossou A, Kessel G, Pel MA and Kamoun S. 2011. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual Review in Phytopathology* 49:507-531. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095326>
- Wang Y, Wu J, Kim SG, Tsuda K, Gupta R, Park SY, Kim ST and Kang KY. 2016. *Magnaporthe oryzae*-Secreted Protein MSP1 Induces Cell Death and Elicits Defense Responses in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29(4), 299–312. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-15-0266-R>
- Wood KJ, Nur M, Gil J, Fletcher K, Lakeman K, Gann D, Gothberg A, Khuu T, Kopetzky J, Naqvi S, Pandya A, Zhang C, Maisonneuve B, Pel M and Michelmore R. 2020. Effector prediction and characterization in the oomycete pathogen *Bremia lactucae* reveal host-recognized WY domain proteins that lack the canonical RXLR motif. *PLoS Pathogens* 16(10):e1009012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009012>
- Wu Y, Sexton W, Yang B and Xiao S. 2023. Genetic approaches to dissect plant nonhost resistance mechanisms. *Molecular Plant Pathology* 24(3), 272–283. <https://doi.org/10.1111/mpp.13290>
- Wu Y, Xun Q, Guo Y, Zhang J, Cheng K, Shi T, He K, Hou S, Gou X and Li J. 2016. Genome-Wide Expression Pattern Analyses of the Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases. *Molecular Plant* 9(2): 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.011>
- Yamankurt G, Stawicki RJ, Posadas DM, Nguyen JQ, Carthew RW and Mirkin CA. 2020. The effector mechanism of siRNA spherical nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(3):1312-1320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915907117>
- Zhang S, Li C, Si J, Han Z and Chen D. 2022. Action Mechanisms of effectors in plant-pathogen interaction. *International Journal of Molecular Science* 23(12):6758. <https://doi.org/10.3390/ijms23126758>
- Zhao S, Shang X, Bi W, Yu X, Liu D, Kang Z, Wang X and Wang X. 2020. Genome-wide identification of effector candidates with conserved motifs from the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* *Frontiers in Microbiology* 11:1188. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01188>
- Zhou JM and Zhang Y. (2020). Plant Immunity: Danger Perception and Signaling. *Cell*, 181(5), 978–989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.028>
- Zhu W, Yu M, Xu R, Bi K, Yu S, Xiong C, Liu Z, Sharon A, Jiang D, Wu M, Gu Q, Gong L, Chen W and Wei W. (2022). *Botrytis cinerea* BcSSP2 protein is a late infection phase, cytotoxic effector. *Environmental Microbiology* 24(8): 3420–3435. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15919>
- Zhu X, Soliman A, Islam MR, Adam LR and Daayf F. 2017. *Verticillium dahliae*'s isochorismatase hydrolase is a virulence factor that contributes to interference with potato's salicylate and jasmonate defense signaling. *Frontiers in Plant Science* 8:399. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00399>
- Zuluaga AP, Vega-Arreguín JC, Fei Z, Ponnala L, Lee SJ, Matas AJ, Patev S, Fry WE and Rose JK. 2016. Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Molecular plant pathology* 17(1): 29–41. <https://doi.org/10.1111/mpp.122630>

# Identification and characterization of microsatellites in isolates of *Peronospora tabacina* collected in tobacco-producing states of Mexico

## Identificación y caracterización de microsatélites en aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en estados productores de tabaco de México

Yadira Margarita Ramos-Barraza, Isabel Cruz-Lachica, Juan Manuel Tovar-Pedraza, José Benigno Valdez-Torres, Isidro Márquez-Zequera, Luis Alfredo Osuna-García, Guillermo Gómez-González, Raymundo Saúl García-Estrada\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, Carr. El Dorado, Km 5.5, Campo El Diez, CP 80110 Culiacán, Sinaloa, México.  
\*Corresponding autor: rsgarcia@ciad.mx

Received: June 16, 2022.

Accepted: March 05, 2023.

Ramos-Barraza YM, Cruz-Lachica I, Tovar-Pedraza JM, Valdez-Torres JB, Márquez-Zequera I, Osuna-García LA, Gómez-González G and García-Estrada RS. 2023. Identification and characterization of microsatellites in isolates of *Peronospora tabacina* collected in tobacco-producing states of Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 229-240.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-5>

First DOI publication: April 05, 2023.

Primera publicación DOI: 05 de Abril, 2023.

**Abstract.** *Peronospora tabacina* is considered the main limiting factor in tobacco production worldwide. In Mexico, information on the genetic diversity of this pathogen is scarce; therefore, the objective of this research was to evaluate 12 microsatellites in 20 isolates collected in the states of Nayarit, Chiapas, and Veracruz. PCR amplification

**Resumen.** *Peronospora tabacina* es considerado el principal factor limitante en la producción de tabaco mundialmente. En México, la información sobre la diversidad genética de este patógeno es escasa; por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar 12 microsatélites en 20 aislados recolectados en los estados de Nayarit, Chiapas y Veracruz. Se realizó la amplificación por PCR y secuenciación de estos microsatélites; así como el alineamiento y comparación de las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Diecinueve aislados mostraron amplificación para los 12 microsatélites evaluados; mientras que, en uno de los aislados no se observó la amplificación de dos microsatélites, pudiéndose determinar que las cepas de *P. tabacina* presentes en México son genéticamente homogéneas. Se observaron regiones de dinucleótidos, la mayoría correspondientes a motivos repetidos (GT)<sub>n</sub> o variaciones (TG)<sub>n</sub>, también se visualizaron motivos (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>

and sequencing of these microsatellites were performed; as well as the alignment and comparison of the sequences deposited in the GenBank database. A total of 19 isolates showed amplification for the 12 microsatellites evaluated, while in one of the isolates, the amplification of two microsatellites was not observed, it being possible to determine that *P. tabacina* isolates present in Nayarit, Chiapas, and Veracruz are genetically homogeneous. Regions of dinucleotides were observed, most corresponding to (GT)<sub>n</sub> repeat motifs or (TG)<sub>n</sub> variations, as well as (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub> and (AG)<sub>n</sub> motifs. The isolates analyzed in this study can be considered products of clonal lines, therefore no genetic diversity was found in these isolates.

**Keywords:** Blue Mold, Oomycetes, PCR, Mildew, SSRs.

*Peronospora tabacina* is a pathogen that causes the disease known as blue mold or tobacco mildew. In the past, it caused significant economic losses in US crops, with estimated losses of \$250 million (Lucas, 1980). This oomycete infects primarily the aerial parts of plants, such as leaves. However, under favorable environmental conditions, it can infect any stage of the crop and cause systemic infections (Milholland *et al.*, 1981; Spurr and Todd, 1982; Caiazza *et al.*, 2006). Its most common reproductive structures are asexual, known as sporangiophores or sporangia, containing multiple diploid nuclei. These sporangia are produced massively and are easily dispersed by wind, being the main means of reproduction and spread of this pathogen (Hall, 1989; Spring *et al.*, 2018). Under optimal environmental conditions, this pathogen can produce over 10<sup>5</sup> sporangia/cm<sup>2</sup> in a single lesion (Cohen, 1976).

y (AG)<sub>n</sub>. Los aislados analizados en este estudio, pueden considerarse productos de líneas clonales por lo que no se observó diversidad genética en dichos aislados.

**Palabras clave:** Moho azul, Mildiu, Oomicetes, PCR, SSRs.

*Peronospora tabacina* es un patógeno que causa la enfermedad conocida como moho azul o mildiu del tabaco y que históricamente ocasionó pérdidas económicas importantes como lo acontecido en cultivos de EE. UU. en donde se observaron pérdidas estimadas en \$250 millones de dólares (Lucas, 1980). Éste oomicete infecta principalmente las partes aéreas de las plantas como las hojas, pero si las condiciones ambientales le favorecen también puede afectar cualquier etapa fenológica del cultivo y ocasionar infecciones sistémicas (Milholland *et al.*, 1981; Spurr y Todd, 1982; Caiazza *et al.*, 2006). Sus estructuras de reproducción asexual conocidas como esporangióforos y esporangios que contienen múltiples núcleos diploides son las más comunes. Dichos esporangios se producen masivamente y son fácilmente dispersados por el viento y son el principal medio de reproducción y propagación de éste patógeno (Hall, 1989; Spring *et al.*, 2018). En condiciones ambientales óptimas, éste patógeno es capaz de producir más de 10<sup>5</sup> esporangios/cm<sup>2</sup> en una sola lesión (Cohen, 1976).

A pesar de la importancia de éste patógeno, son pocos los estudios realizados para conocer su biología y genética poblacional; lo que puede deberse a la dificultad que representa trabajar con un patógeno parásito obligado y que dificulta también caracterizarlo y obtener un número adecuado de aislados (Derevnina *et al.*, 2015; Nowicki *et al.*, 2022).

Despite its importance, few studies have investigated the biology and population genetics of this pathogen. This may be because it is an obligate parasite, which makes it difficult to characterize and obtain a sufficient number of isolates (Derevnina *et al.*, 2015; Nowicki *et al.*, 2022).

Genetic variation studies in plant pathogen populations have become increasingly important due to the availability of several molecular markers. These studies have applications in detection, diagnosis, taxonomy, epidemiology, and population structure, each requiring different sampling, genetic markers, and analyses (Milgroom, 1997). Moreover, genotypic diversity measurements and patterns within populations can infer clonality or recombination (Milgroom, 1996).

DNA markers are widely used for analyzing plant pathogen population dynamics due to their high precision (Milgroom and Peever, 2003). Microsatellites, also known as Simple Sequence Repeats (SSRs), are one of the available molecular markers that offer significant advantages. They consist of short DNA sequences of 1 to 6 nucleotides, repeated a certain number of times in tandem, and are abundant in the genomes of most eukaryotic organisms (Gupta *et al.*, 1996). Microsatellite analysis uses the PCR technique, requires small amounts of DNA, and its codominant nature makes microsatellites one of the most preferred markers for marker-assisted selection programs and genetic mapping and diversity studies (Gupta *et al.*, 1996; Jarne and Lagoda, 1996). Microsatellites are ideal for obtaining the genetic identification and fingerprinting of many organisms, including fungi and oomycetes, that show high polymorphism.

Several studies have aimed to characterize microsatellites of *Peronospora tabacina*. One such study was conducted by Trigiano *et al.* (2012), in which 10 microsatellite loci were characterized in 44 isolates of this pathogen collected from various

Los estudios de variación genética en poblaciones de patógenos de plantas han aumentado de relevancia en los últimos tiempos, debido a que actualmente existen varios marcadores moleculares disponibles. Algunas de las aplicaciones del estudio de la variación genética en la patología vegetal son la detección, diagnóstico, taxonomía, epidemiología y estructura de la población y cada una de éstas requiere diferentes tipos de muestreo, marcadores genéticos y análisis (Milgroom, 1997). A su vez, la medida y patrones de diversidad genotípica dentro de las poblaciones se pueden utilizar para inferir si las poblaciones son clonales o han experimentado recombinación (Milgroom, 1996).

Los marcadores de ADN son utilizados ampliamente para analizar la dinámica de las poblaciones de los patógenos de plantas debido a sus altos niveles de precisión (Milgroom y Peever, 2003). Entre los marcadores moleculares disponibles, los microsatélites, también llamados secuencias simples repetidas (SSRs, Simple Sequence Repeats), ofrecen apreciables ventajas, ya que son secuencias cortas de ADN de 1 a 6 mono-, di-, tri-, tetra-, o pentanucleótidos, repetidos cierto número de veces o en tandem y se encuentran en abundancia dentro de los genomas de la mayoría de los organismos eucariotas (Gupta *et al.*, 1996). Esta metodología se basa en la técnica de PCR y requiere pequeñas cantidades de ADN y su naturaleza codominante hace de los microsatélites uno de los marcadores más escogidos para los programas de selección asistida por marcadores y para los estudios de mapeo genético y de diversidad (Gupta *et al.*, 1996; Jarne y Lagoda, 1996). Por todo esto, los microsatélites son ideales para obtener la identificación y la huella genética de muchos organismos, incluyendo a los hongos y oomicetes debido a su alto polimorfismo.

Existen algunos estudios que han tenido como objetivo caracterizar microsatélites de *Peronospora tabacina*, tal es el caso del estudio realizado por

regions of the world. The microsatellite loci were found to be polymorphic. Polymorphism is the genetic variation through time in populations, resulting from some type of mutation. The amplification of these microsatellites allows visualizing or indicating the presence of allelic variants, which is essential for distinguishing groups, populations, isolates, species, or higher taxonomic groups, identifying the source of populations, estimating population divergences, and identifying the gene flow between natural banks or seedbeds. Furthermore, seven of the ten microsatellites characterized in the study by Trigiano *et al.* (2012) were evaluated by Nowicki *et al.* (2022), who added two additional microsatellites to their analysis to assess the genetic diversity in 122 *P. tabacina* isolates. Thus, the objective of the present study is to identify and characterize molecular microsatellites in isolates of *Peronospora tabacina* collected from tobacco fields distributed across three producing states in Mexico, using 12 microsatellites.

Leaf samples with blue mold symptoms and pathogen signs were collected from commercial tobacco fields in Nayarit, Chiapas, and Veracruz, Mexico, between 2018 and 2021. Samples were taken to the Phytopathology Laboratory of the Research Center for Food and Development Culiacán Unit, where they were air-dried daily and stored between newspapers.

DNA extraction from each *P. tabacina* isolate was performed using the CTAB method according to the method reported by Voigt *et al.* (1999). The quantification of the obtained DNA was carried out using a Nanodrop One (Thermo Scientific, USA). A polymerase chain reaction (PCR) was initially performed for genotyping and confirmation of the genus and species of *P. tabacina* using the specific oligonucleotides PTAB and ITS4 under specific conditions described by Ristaino *et al.* (2007).

Trigiano *et al.* (2012) en donde se caracterizaron 10 loci de microsatélites en 44 aislados de este patógeno recolectados de diversas regiones del mundo, los cuales fueron polimórficos; es decir, la amplificación de éstos microsatélites permite visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo; dicha variación genética detectada es conocida como polimorfismo y es la que permite separar grupos, poblaciones, aislados, especies o grupos taxonómicos mayores, identificar la fuente de las poblaciones, estimar divergencias poblacionales e identificar el flujo genético entre bancos naturales o semilleros. A su vez, siete microsatélites de los 10 caracterizados en el estudio de Trigiano *et al.* (2012) se evaluaron por Nowicki *et al.* (2022) quienes adicionaron a su análisis otros dos microsatélites, con los que evaluaron la diversidad genética en 122 aislados de *P. tabacina*. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar microsatélites moleculares en aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en campos con tabaco distribuidos en tres estados productores en México, mediante el uso de 12 microsatélites.

Durante los años de 2018 a 2021, se recolectaron muestras de hojas de tabaco con la presencia de síntomas de moho azul y signos del patógeno, en campos comerciales distribuidos en las regiones tabacaleras de Nayarit, Chiapas y Veracruz, México. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Culiacán y posteriormente, se preservaron entre papel periódico y se airearon cada 24 h hasta su secado y posterior uso.

La extracción de ADN de cada uno de los aislados de *P. tabacina* se realizó mediante el método de CTAB de acuerdo a la metodología reportada por Voigt *et al.* (1999). La cuantificación del ADN

Subsequently, the amplification and genotyping of 12 microsatellites were performed using the method proposed by Trigiano *et al.* (2012) and Nowicki *et al.* (2022). The PCR was carried out in a 15  $\mu\text{L}$  reaction volume using 7.5  $\mu\text{L}$  of Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  of each oligonucleotide, 4.5  $\mu\text{L}$  of water, and 1  $\mu\text{L}$  of DNA (15  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ). The amplification conditions were as described by Trigiano *et al.* (2012). The amplified products were separated in 2% agarose gels stained with Gel Red and run in an electrophoresis chamber (BioRad, USA) at 80 V for 60 min. The expected amplicons were visualized using a Gel Doc™ XR + Imaging System photodocumentor (BioRad, USA). The purification of the amplicons was performed using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, USA) following the manufacturer's instructions.

The purified DNA products were sent for sequencing to the National Laboratory of Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology located in San Luis Potosí, S.L.P. The obtained DNA sequences were manually aligned and edited using BioEdit Sequence Alignment Editor Software Version 7.2.5.0 (Hall, 2011). Subsequently, the consensus sequences obtained were compared with the sequences deposited in the GenBank Overview NCBI database.

A total of 20 isolates of *Peronospora tabacina* were collected from different tobacco fields in Nayarit, Veracruz, and Chiapas (Table 1). The PCR technique was used to process the 20 isolates using the specific oligonucleotide pairs PTAB and ITS4 for *P. tabacina*, resulting in a 764 bp fragment in each isolate, which confirmed the identity of the oomycete under study.

According to the analysis of the amplification of the 12 microsatellites evaluated, 19 isolates showed 100% amplification for all microsatellites evaluated. For isolate Pt14Ta from Tantoyuca,

obtenido se llevó a cabo en un Nanodrop One (Thermo Scientific, EE. UU.). En un primer paso, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa para la genotipificación y confirmación del género y especie de *P. tabacina* mediante la utilización de los oligonucleótidos específicos PTAB e ITS4, considerando las condiciones específicas descritas por Ristaino *et al.* (2007). Posteriormente, la amplificación de 12 microsatélites y genotipificación de los mismos se realizó utilizando la metodología propuesta por Trigiano *et al.* (2012) y Nowicki *et al.* (2022). La PCR se realizó en un volumen de reacción de 15  $\mu\text{L}$  utilizando por reacción 7.5  $\mu\text{L}$  de Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido, 4.5  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de ADN (15  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Trigiano *et al.* (2012). Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% teñidos con Gel Red y se corrieron en una cámara de electroforesis (BioRad, EE. UU) con 80 V durante 60 min. La visualización de los amplicones esperados se realizó en un fotodocumentador Imager Gel Doc™ XR + Imaging Sistem (BioRad, EE. UU.). La purificación de los amplicones se realizó con el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EE. UU.), de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante.

Los productos de ADN purificados se enviaron para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental, ubicado en San Luis Potosí, S. L. P. Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon y editaron manualmente usando el Software BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.2.5.0 (Hall, 2011). Posteriormente las secuencias consenso obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank Overview NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Se recolectaron un total de 20 aislados de *Peronospora tabacina* de diferentes campos de cultivo

**Table 1. Isolates of *Peronospora tabacina* collected from tobacco plants with the presence of blue mold.**

**Cuadro 1. Aislados de *Peronospora tabacina* recolectados de plantas de tabaco con presencia de moho azul y utilizadas en este estudio.**

| ID Aislados | Localización                              | Coordenadas           |
|-------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| Pt1SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'49"N95°9'14"O   |
| Pt3SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'17"N95°9'34"O   |
| Pt4SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'22"N95°9'32"O   |
| Pt5SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'37"N95°9'27"O   |
| Pt6SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'25"N95°9'58"O   |
| Pt7SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'41"N95°9'53"O   |
| Pt8SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'47"N95°9'2"O    |
| Pt9SA       | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 18°25'35"N95°9'10"O   |
| Pt10SA      | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 21°17'23"N98°17'35"O  |
| Pt11SA      | San Andrés, Tuxtla, Ver.                  | 21°17'12"N98°17'40"O  |
| Pt13Ta      | Tantoyuca, Ver.                           | 21°18'12"N98°21'54"O  |
| Pt14Ta      | Tantoyuca, Ver.                           | 21°18'13"N98°21'56"O  |
| Pt15Ta      | Tantoyuca, Ver.                           | 21°18'3"N98°21'24"O   |
| Pt16Na      | Santiago Ixcuitla, Nay.                   | 21°43'40"N105°15'13"O |
| Pt17Na      | Santiago Ixcuitla, Nay.                   | 21°43'18"N105°15'35"O |
| Pt18Na      | Santiago Ixcuitla, Nay.                   | 21°43'20"N105°15'20"O |
| Pt19Na      | Acaponeta, Nay.                           | 22°29'21"N105°28'8"O  |
| Pt20Na      | Rosamorada, Nay.                          | 21°57'48"N105°13'8"O  |
| Pt21Ch      | Congregación Reforma,<br>Tapachula, Chis. | 14°47'31"N92°18'3"O   |
| Pt22Ch      | El Manzano, Tapachula, Chis.              | 14°45'40"N92°18'16"O  |

Veracruz, amplification was not observed for two of the 12 oligonucleotide pairs evaluated (Table 2). The isolate was thus considered a partially clonal strain.

To confirm the results, the 12 microsatellite amplicons were sequenced for isolates Pt7SA and Pt16Na, and the consensus sequences obtained were compared with sequences deposited in GenBank.

The consensus sequences showed identity percentages ranging from 95.83 to 100% (Table 3) compared to the sequences of the *P. tabacina* isolates from the study by Trigiano *et al.* (2012). It should be mentioned that for the oligonucleotide pairs of the microsatellites PT034, PT041, and PT056, poor quality was observed in the obtained sequences even though they were performed in triplicate, so it can be considered that there is some problem with

de tabaco de Nayarit, Veracruz y Chiapas (Cuadro 1). Se realizó la técnica de PCR para procesar los 20 aislados, utilizando los pares de oligonucleótidos específicos PTAB e ITS4 para *P. tabacina*, visualizando un fragmento de 764 pb en cada uno de los aislados, corroborando la identidad del oomicete en estudio.

De acuerdo al análisis de la amplificación de los 12 microsatélites evaluados, 19 aislados mostraron 100% de amplificación para todos los microsatélites evaluados; mientras que, para el aislado Pt14Ta proveniente de Tantoyuca, Veracruz no se observó la amplificación para dos de los 12 pares de oligonucleótidos evaluados (Cuadro 2), considerándose como una cepa parcialmente clonal.

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos, los 12 amplicones de los microsatélites



**Table 2. Amplification of 12 microsatellites in 20 isolates of *Peronospora tabacina* collected in Mexico.**  
**Cuadro 2. Amplificación de 12 microsatélites en 20 aislados de *Peronospora tabacina* recolectados en México.**

| Oligonucleótidos | Muestras |        |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |      |      |
|------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|------|
|                  | Pt1 Sa   | Pt3 Sa | Pt4 Sa | Pt5 Sa | Pt6 Sa | Pt7 Sa | Pt8 Sa | Pt9 Sa | Pt10 Sa | Pt11 Sa | Pt13 Ta | Pt14 Ta | Pt15 Ta | Pt16 Na | Pt17 Na | Pt18 Na | Pt19 Na | Pt20 Na | Pt21 | Pt22 |
| PT034            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT041            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT002            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT004            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| <b>PT007</b>     | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | -       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT014            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT028            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT032            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| <b>PT047</b>     | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | -       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT048            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT054            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |
| PT056            | +        | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +       | +    | +    |

their design. In all the evaluated isolates in this study, the sequences (100%) of the microsatellites comprised dinucleotide regions (Table 4), mostly corresponding to repeated motifs or structures (GT)<sub>n</sub> or variations (TG)<sub>n</sub>. Motifs (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, and (AG)<sub>n</sub> were also visualized, and these were perfect repetitions since the sequences were not interrupted by non-repeated nucleotides.

With the obtained data, it was determined that the *P. tabacina* isolates present in the tobacco fields of the main producing states in Mexico are genetically homogeneous since the amplification of the reference microsatellites was observed in the 20 isolates evaluated in this study. Likewise, in a study by Edreva *et al.* (1998), it was observed that *P. tabacina* isolates collected in Europe (France and Bulgaria) between 1978 and 1992 were genetically stable. These results were supported by the observation of a high similarity of the isoenzyme patterns of natural populations of the pathogen and the non-significant changes in these patterns. Similarly, Zipper *et al.* (2009) also reported genetic uniformity in European isolates of *P. tabacina*.

evaluados se secuenciaron para los aislados Pt7SA y Pt16Na y las secuencias consenso obtenidas se compararon con secuencias depositadas en el GenBank.

Las secuencias consenso mostraron porcentajes de identidad que van de 95.83 a 100% (Cuadro 3) comparadas con las secuencias de los aislados de *P. tabacina* del estudio de Trigiano *et al.* (2012). Cabe mencionar que, para los pares de oligonucleótidos de los microsatélites PT034, PT041 y PT056, se observó mala calidad en las secuencias obtenidas aun cuando éstas se realizaron por triplicado, por lo que se puede considerar que existe algún problema con el diseño de los mismos.

En el total de los aislados evaluados en este estudio, las secuencias (100%) de los microsatélites comprendían regiones de dinucleótidos (Cuadro 4), la mayoría correspondientes a motivos o estructuras repetidas (GT)<sub>n</sub> o variaciones (TG)<sub>n</sub>, también se visualizaron motivos (AC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub> y (AG)<sub>n</sub>, observándose que estas eran repeticiones perfectas ya que las secuencias no estaban interrumpidas por nucleótidos no repetidos.





has a higher degree of genotypic diversity (Chen and McDonald, 1996). Populations that reproduce sexually produce offspring with a high level of genetic diversity, while the variation of asexual populations is limited by mutations that can occur within populations (McDonald, 1997). Notably, *P. tabacina* is a pathogen that mainly reproduces asexually through sporangia and sporangiophores, while oospores, the sexual reproductive structures, are rarely observed (Blanco-Meneses *et al.*, 2017; Nowicki *et al.*, 2022).

These results differ from those reported by Nowicki *et al.* (2022), who observed high genetic diversity and gene flow using nine microsatellite molecular markers evaluated in 122 *P. tabacina* isolates collected on three continents (Central, Southern, and Western Europe, the Middle East, Central and North America, and Australia). However, they reported the presence of partially clonal subpopulations among the isolates they evaluated. Additionally, Nowicki *et al.* (2022) mentioned that the high genetic variation and population structure observed among the evaluated isolates could be explained by continuous gene flow across continents and by the exchange of infected plant material and/or the dispersal of *P. tabacina* sporangia over long distances through wind (LaMondia and Aylor, 2001).

The present study determined that the *Peronospora tabacina* isolates causing the disease known as blue mold of tobacco in the main tobacco-producing states in Mexico are genetically homogeneous.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the financial contribution of CONACYT for the realization of this project and also to the Phytopathology laboratory, technicians and researchers of the Research Center for Food and Development Culiacán Unit. CAADES and AMHPAC.

observó la amplificación de los microsatélites de referencia en los 20 aislados evaluados en este estudio. Así mismo, en un estudio realizado por Edreva *et al.* (1998), se observó que aislados de *P. tabacina* recolectados en Europa (Francia y Bulgaria) entre 1978 y 1992, fueron genéticamente estables, sustentando lo anterior con la observación de una alta similitud de los patrones de isoenzimas de las poblaciones naturales del patógeno, y los cambios no significativos en estos patrones. Similarmente, Zipper *et al.* (2009), también reportaron uniformidad genética en aislados europeos de *P. tabacina*.

Los oomicetes son organismos diploides cuyo ciclo de vida incluye tanto reproducción asexual como sexual. Los organismos que se reproducen asexualmente tienden a exhibir un alto grado de clonalidad, mientras que los organismos que se reproducen sexualmente generalmente tienen un mayor grado de diversidad genotípica (Chen y McDonald, 1996). Por el contrario, las poblaciones que se reproducen sexualmente producen descendencia con un alto nivel de diversidad genética. Por esta razón, las recombinaciones genéticas resultado de la reproducción sexual permiten más combinaciones; mientras que, la variación de las poblaciones asexuales es limitada por la mutación que puede ocurrir dentro de las poblaciones (McDonald, 1997). Cabe mencionar que *P. tabacina* es un patógeno que se reproduce principalmente por vía asexual mediante esporangios y esporangióforos; mientras que, las oosporas que son estructuras de reproducción sexual son raramente observadas (Blanco-Meneses *et al.*, 2017, Nowicki *et al.*, 2022).

Estos resultados difieren de los reportados por Nowicki *et al.* (2022), quienes observaron alta diversidad genética y flujo de genes mediante el uso de nueve marcadores moleculares microsatélites evaluados en 122 aislados de *P. tabacina* recolectados en tres continentes (Europa Central, Meridional

## CITED LITERATURE

- Blanco-Meneses M, Carbone I, and Ristaino JB. 2017. Population structure and migration of the tobacco blue mold pathogen, *Peronospora tabacina*, into North America and Europe. *Molecular Ecology* 27:737-751. <https://doi.org/10.1111/mec.14453>
- Caiazza R, Tarantino P, Porrone F and Lahoz E. 2006. Detection and early diagnosis of *Peronospora tabacina* Adam in tobacco plant with systemic infection. *Journal of Phytopathology* 154:432-435. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01123.x>
- Chen RS and McDonald BA. 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetic* 142:1119-1127. <https://doi.org/10.1093/genetics/142.4.1119>
- Cohen Y. 1976. Interacting effects of light and temperature on sporulation of *Peronospora tabacina* on tobacco leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 29:281-289. <https://doi.org/10.1071/B19760281>
- Derevnina L, Chin-Wo-Reyes S, Martin F, Wood K, Froenicke L, Spring O and Michelmore R. 2015. Genome sequence and architecture of the tobacco downy mildew pathogen *Peronospora tabacina*. *International Society for Molecular Plant Microbe Interactions* 11:1198-1215. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-05-15-0112-R>
- Edreva A, Delon R, and Coussirat J. 1998. Variability of *Peronospora tabacina* A. an isoenzyme study. *Contributions to Tobacco & Nicotine Research. Beiträge zur Tabakforschung* 18:1. pp. 3-13. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0663>
- Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC and Ramesh B. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70:1. pp. 45-54. <http://repository.ias.ac.in/74979/>
- Hall G. 1989. *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. CDI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *Mycopathologia* 106:183-211. <http://dx.doi.org/10.1079/DFB/20056400975>
- Hall T. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* 2:1. pp. 60-61. [https://www.researchgate.net/publication/258565830\\_BioEdit\\_An\\_important\\_software\\_for\\_molecular\\_biology](https://www.researchgate.net/publication/258565830_BioEdit_An_important_software_for_molecular_biology)
- Jarne P and Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
- LaMondia JA and Aylor DE. 2001. Epidemiology and management of a periodically introduced pathogen. *Biological Invasions* 3:273-282. <https://doi.org/10.1023/A:1015273512111>
- Lucas GB. The war against blue mold. *Science*. 1980. 210 (4466):147-53. <http://dx.doi.org/10.1126/science.210.4466.147>. PMID: 17741271.

y Occidental, Medio Oriente, América Central y del Norte y Australia); sin embargo, ellos reportaron la presencia de subpoblaciones parcialmente clonales entre los aislados que evaluaron. Adicionalmente, Nowicki *et al.* (2022) mencionaron que la alta variación genética y estructura poblacional observada entre los aislados evaluados podrían explicarse por el flujo continuo de genes que se da a través de los continentes y por el intercambio de material vegetal infectado y/o por la dispersión de los esporangios de *P. tabacina* a largas distancias a través del viento (LaMondia y Aylor, 2001).

En este estudio se determinó que los aislados de *Peronospora tabacina* causantes de la enfermedad conocida como moho azul del tabaco, presentes en los principales estados productores de tabaco en México son genéticamente homogéneas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la contribución económica del CONACYT para la realización de éste proyecto y de igual manera al laboratorio de Fitopatología, técnicos e investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Culiacán. CAADES y AMHPAC.

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

- McDermott JM and McDonald BA. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 1:353-373. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.002033>
- McDonald BA. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.448>
- Milgroom MG. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34:457-477. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.457>
- Milgroom MG. 1997. Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. *Journal of Plant Pathology* 79:1-13. <https://www.jstor.org/stable/41997862>

- Milgroom MG and Peever TL. 2003. Population biology of plant pathogens. The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease* 87:608-617. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.6.608>
- Milholland R, Papadopoulou J and Daykin M. 1981. Histopathology of *Peronospora tabacina* in systemically infected burley tobacco. *Phytopathology* 71:73-76. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n01\\_73.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n01_73.pdf)
- Nowicki M, Hadziabdic D, Trigiano R, Runge F, Thines M, Boggess S, Ristaino J and Spring O. 2022. Microsatellite markers from *Peronospora tabacina*, the cause of blue mold of tobacco, reveal species origin, population structure, and high gene flow. *Phytopathology* 112:422-434. <https://doi.org/10.1094/PHTO-03-21-0092-R>
- Ristaino JB, Johnson A, Blanco-Meneses M and Liu B. 2007. Identification of the tobacco blue mold pathogen, *Peronospora tabacina*, by polymerase chain reaction. *Plant Disease* 91:685-691. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0685>
- Spring O, Gomez-Zeledon J, Hadziabdic D, Trigiano RN, Thines M and Lebeda A. 2018. Biological characteristics and assessment of virulence diversity in pathosystems of economically important biotrophic oomycetes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 37:439-495. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1530848>
- Spurr H and Todd F. 1982. Oospores in blue mold diseased North Carolina burley and flue-cured tobacco. *Tobacco Science* 26:44-46. <https://www.coresta.org/abstracts/oospores-blue-mold-diseased-north-carolina-burley-and-flue-cured-tobacco-35746.html>
- Trigiano RN, Wadl PA, Dean D, Hadziabdic D, Scheffler BE, Runge F, Telle S, Thines M, Ristaino J and Spring O. 2012. Ten polymorphic microsatellite loci identified from a small insert genomic library for *Peronospora tabacina*. *Mycologia* 104:633-640. <https://doi.org/10.3852/11-288>
- 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* 12:3957-3964. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.3957-3964.1999>
- Zipper R, Hammer TR and Spring O. 2009. PCR-based monitoring of recent isolates of tobacco blue mold from Europe reveals the presence of two genetically distinct phenotypes differing in fungicide sensitivity. *European Journal of Plant Pathology* 123:367-375. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9373-3>

# Fungi associated with the decline and death of *Phoenix canariensis* in Mexico City

## Hongos asociados a la declinación y muerte de *Phoenix canariensis* en la Ciudad de México

**Andrés Quezada-Salinas**, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Avenida Centenario de la Educación, Colonia Santa Ana, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México, México; **Silvia Edith García-Díaz\***, Área de Parasitología Forestal, División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; **Alejandra Almaraz-Sánchez**, **Dionicio Alvarado-Rosales**, **Luz de Lourdes Saavedra-Romero**, **Sergio Aranda-Ocampo**, Programa de Fitopatología, <sup>1</sup>Programa de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, C.P. 56230, Texcoco, Estado de México, México; **Carlos Fredy-Ortiz**, Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Periférico Carlos A. Molina s/n km 3.5, C.P. 86500, Cárdenas, Tabasco, México; <sup>1</sup>**Armando Equihua-Martínez**.

\*Corresponding autor: edith65@gmail.com

Received: February 15, 2023.

Accepted: April 17, 2023.

Quezada-Salinas A, García-Díaz SE, Almaraz-Sánchez A, Alvarado-Rosales D, Saavedra-Romero LdeL, Aranda-Ocampo S, Fredy-Ortiz C and Equihua-Martínez A. 2023. Fungi associated with the decline and death of *Phoenix canariensis* in Mexico City. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 241-256.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-8>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

**Abstract.** The decline and death of palms (*Phoenix canariensis*) in Mexico City is a problem that has increased in the last five years, causing the death of more than 500 palms and others with different degrees of damage. The causal agent has not been determined, so the present study aimed to identify

**Resumen.** El declinamiento y muerte de palmeras (*Phoenix canariensis*) en la Ciudad de México ha aumentado en los últimos cinco años hasta alcanzar la muerte de más de 500 palmeras y otras más con diferentes grados de daño. El o los agentes causales no han sido determinados, por lo que el presente estudio tuvo como objetivo identificar los hongos asociados al declinamiento y muerte de palmeras (*Phoenix canariensis*) en la Ciudad de México. Muestras de tejido vegetal sintomático del tronco, peciolo, raquis y foliolos, fueron colectadas en nueve sitios de muestreo representativos, en siete Alcaldías de la Ciudad de México, de febrero a agosto de 2022. Se obtuvieron 144 aislados de hongos que comprendieron 11 especies. Las especies identificadas con mayor frecuencia fueron *Nalanthamala vermoeseni*, *Lasiodiplodia* sp., *Neopestalotiopsis* sp., y *Serenomyces* sp., presentes

the associated fungi of the decline and death of palms (*Phoenix canariensis*) in Mexico City. From February to August 2022, samples of symptomatic plant tissue from the trunk, petiole, rachis, and leaflets were collected at nine representative sampling sites in seven Boroughs of Mexico City. A total of 144 fungal isolates were obtained, comprising 11 different species. The species with the highest frequency were: *Nalanthamala vermoesonii*, *Lasiodiplodia* sp., *Neopestalotiopsis* sp., and *Serenomyces* sp., present mainly on the petiole and rachis; and *Alternaria alternata* and *Phoma glomerata* in the leaflets, these species have been reported as causative agents of different diseases in other countries and are reported for the first time in Mexico associated with *P. canariensis*. The information generated will allow establishing management measures tending to reduce the death of palms.

**Keywords:** Palm, tissues, symptoms.

Climate change threatens the health and survival of urban trees, as well as the diverse benefits that they provide the inhabitants of cities. By the year 2050, most species will be at risk due to the changes projected for temperature and rainfall. Along with the abiotic stress caused by global warming, urban trees face increasing emerging diseases, particularly those caused by fungal pathogens and oomycetes (Rafiqi *et al.*, 2022). Although they are not classified as trees, palms play an important role in the biodiversity of different urban areas or in forestry; however, the majority of studies on the pathologies have been carried out on species of agronomic interest, such as the date palm (*Phoenix dactylifera*), leaving an area of study to determine what takes place in ornamental species found in urban areas. In this sense, the genus *Phoenix*

principalmente en peciolo y raquis; y *Alternaria alternata* y *Phoma glomerata* en foliolos, dichas especies han sido reportadas como agentes causales de enfermedades en palmeras en otros países y reportadas por primera vez en México asociadas a *P. canariensis*. La información generada permitirá establecer medidas de manejo tendientes a reducir la muerte de palmeras.

**Palabras clave:** Palmera, tejidos, síntomas.

El cambio climático amenaza la salud y la supervivencia de los árboles urbanos, así como a los diversos beneficios que brindan a los habitantes. Para el año 2050, la mayor parte de las especies estarán en riesgo debido a los cambios proyectados en la temperatura y precipitación. Junto con el estrés abiótico causado por el calentamiento global, los árboles urbanos se enfrentan cada vez más a enfermedades infecciosas emergentes, en particular las causadas por patógenos fúngicos y oomicetos (Rafiqi *et al.*, 2022). Aunque no son clasificados como árboles, las palmeras juegan un papel importante en la biodiversidad en diferentes áreas urbanas o en el ámbito de la arboricultura; sin embargo; la mayoría de los estudios realizados sobre las patologías se han llevado a cabo en especies de interés agronómico como palma datilera (*Phoenix dactylifera*) dejando un área de estudio para determinar lo que sucede en las especies ornamentales presentes en áreas urbanas. En este sentido, el género *Phoenix* (Phoeniceae: Coryphoideae) comprende especies que presentan una distribución geográfica amplia y diversa (Barrow, 1998). Ocupan hábitats muy diversos que van desde zonas costeras hasta zonas de 2000 msnm. Entre las primeras se encuentran *P. canariensis*, *P. reclinata*, *P. roebeleni* y *P. sylvestris*. *P. dactylifera* es la única de interés agronómico. *Phoenix*



(Phoeniceae: Coryphoideae) comprises species that display a wide and diverse geographic distribution (Barrow, 1998). They live in very diverse habitats which range from coastal areas to areas 2000 masl. The former includes *P. canariensis*, *P. reclinata*, *P. roebeleni* and *P. sylvestris*. *P. dactylifera* is the only one of agronomic interest. *Phoenix canariensis* is endemic to the Canary Islands, off the coast of western Africa (Rivera *et al.*, 2013). In their natural habitat, they grow to about 18 to 20 m in height, unless affected by pests or diseases, the plant can live up to 200 and 300 years. Completely mature palms can weight up to 10 tons (Barrow, 1998). This palm has diverse uses: as an ornamental plant, it is enormously valuable, since it is probably the most widely used palm in gardening worldwide, in comparison with other resistant ornamental palm species, such as the Californian fan palm (*Washingtonia filifera*) and the Mexican fan palm (*W. robusta*). *Phoenix canariensis* is distributed worldwide in temperate and warm areas (Spennemann, 2018). In Mexico City, this plant species is enormously important, since it is a part of its landscape identity; there are an estimated 15 thousand palms distributed in the different boroughs (SEDEMA, 2022). However, since 2011 there have been records of palm mortality (SEDEMA, 2021), supposed due to biotic factors, mostly caused by fungi, without having determined the causal agent, therefore the problem persists, and is on the rise, with 500 dead palms on record to date (SEDEMA, 2022). Due to this, the aim of this work was to determine the fungi related to symptoms of decline and death of canary palms in Mexico City, in order to propose the best management strategies.

Nine sites with palms with symptoms of decline and death were sampled: Avenida Paseo de las Palmas (APP) with nine palms, Diagonal San Antonio (DSA) with four, Campestre Churubusco Golf Club (CGC) with four, El Papalote Museo del Niño (PMN) with seven, La Glorieta de la Palma

*canariensis* es endémica de las Islas Canarias frente a la costa oeste de África (Rivera *et al.*, 2013). En su entorno natural crecen entre 18 y 20 m de altura, a menos que se vea afectada por enfermedades o plagas, la planta puede vivir entre 200 y 300 años. Las palmeras completamente maduras pueden pesar hasta 10 toneladas (Barrow, 1998). Esta palma tiene diversos usos, como ornamental posee un enorme valor, siendo probablemente la palma más utilizada en jardinería en todo el mundo, en comparación con otras especies de palmeras ornamentales resistentes como la palma de abanico californiana (*Washingtonia filifera*) y la palma de abanico mexicana (*W. robusta*). *Phoenix canariensis* se distribuye a nivel mundial en zonas templadas y cálidas (Spennemann, 2018). En la Ciudad de México, esta especie es una planta de suma importancia, ya que forma parte de su identidad paisajista; se estima que hay alrededor de 15 mil palmeras distribuidas en las diferentes Alcaldías (SEDEMA, 2022). Sin embargo, desde el 2011, se tienen registros de mortalidad de palmeras (SEDEMA, 2021), presuntamente debido a factores bióticos principalmente causadas por hongos, sin haber determinado el agente causal por lo que el problema persiste y va en aumento teniendo hasta el momento un registro de 500 palmeras muertas (SEDEMA, 2022). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar los hongos asociados a palmeras canarias con síntomas de declinamiento y muerte en la Ciudad de México, con la finalidad de proponer las mejores estrategias de manejo.

Se muestrearon nueve sitios con palmas en declinamiento y muerte, que fueron: La Avenida Paseo de las Palmas (APP) con nueve palmeras, Diagonal San Antonio (DSA) con cuatro, Club de Golf Campestre Churubusco (CGC) con cuatro, El Papalote Museo del Niño (PMN) con siete, La Glorieta de la Palma (LGP) con seis, Ferrería (FER) con siete, Sara Esquina Saúl (SES) con siete,

(LGP) with six, Ferrería (FER) with seven, Sara corner with Saúl (SES) with seven, Anselmo de la Portilla (ADP) with six and 535 Avenue corner with Talismán (AET) with six, for a total of 56 palms in Mexico City.

Using directed visual sampling, from February to August of 2022, 10 asymptomatic palms were selected, along with 46 with symptoms of chlorosis, necrosis and death, which were classified based on the proportion of living crown (Prcv), using a scale of modified health visual evaluation of the protocols by Blair *et al.* (2019ab) and Bond (2012), being (a) a healthy or asymptomatic palm with a Prcv > 6; Initial, between 5 and 6; Intermediate = 4; and advanced,  $\leq 3$ .

A sample of trunk, petiole, rachis and leaflet was taken from every palm, for a total of 224 samples analyzed. They were separately placed in airtight polyethylene bags and transported in ice chests for processing in the Forest Pathology lab in the Plant Health program of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

For the isolation of fungi, each sample was washed with a 0.5 % sodium hypochlorite solution and dried with sterile paper towels. They were cut in 5 mm<sup>2</sup> pieces from the margin between healthy and diseased tissue, then disinfested with a 3 % sodium hypochlorite solution for 2 min, rinsed three times with distilled water for 1 min and dried at room temperature on sterilized paper towels. They were then plated in Petri dishes with water-agar (AA) medium and checked every 24 hours for mycelial growth. Once the mycelium developed, pieces of culture medium were taken and aseptically transferred onto potato-dextrose-agar (PDA) medium and incubated at 22 °C with a 12 h photoperiod until structures developed. Monoconidial cultures were obtained, which were preserved in tubes with PDA covered with sterile mineral oil at 15 °C for their later study. Likewise, humid chambers were performed to promote

Anselmo de la Portilla (ADP) con seis y Avenida 535 Esquina Talismán (AET) con seis dando un total de 56 palmeras en la Ciudad de México.

Mediante muestreo visual dirigido, de febrero a agosto de 2022, se seleccionaron 10 palmeras asintomáticas y 46 con síntomas de clorosis, necrosis y muerte, las cuales se clasificaron con base a la proporción de corona viva (Prcv), empleando una escala de evaluación visual de salud modificada de los protocolos de Blair *et al.* (2019ab) y Bond (2012), siendo: (a) palmera sana o asintomática con una Prcv > 6; inicial entre 5 y 6; intermedia = 4, avanzada  $\leq 3$ .

Se tomó una muestra de tronco, peciolo, raquis y foliolos por palmera, dando un total de 224 muestras analizadas; se depositaron por separado en bolsas de polietileno herméticas y se transportaron en hieleras para su procesamiento en el laboratorio de Patología Forestal del Programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Para el aislamiento de hongos, cada muestra se lavó con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % y se secaron con papel absorbente estéril; se cortaron trozos de 5 mm<sup>2</sup> del margen entre tejido sano y enfermo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril durante 1 min y se secaron a temperatura ambiente sobre papel absorbente estéril; posteriormente se sembraron en cajas Petri con medio agua-agar (AA), se revisaron cada 24 horas para la detección de crecimiento de micelio. Una vez desarrollado el micelio, se tomaron trozos de medio de cultivo y se transfirieron asépticamente a medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 22 °C con un fotoperiodo de 12 h hasta el desarrollo de estructuras. Se obtuvieron cultivos monoconidiales que fueron preservados en tubos con PDA cubiertos con aceite mineral estéril a 15 °C para su posterior estudio. Asimismo, se realizaron cámaras húmedas de tejido vegetal para propiciar la esporulación de conidiomatas

the sporulation of conidiomata on the surface of diseased plant tissue. The fungal cultures that developed were placed in Petri dishes with culture medium for their cultural and morphometric characterizations using the literature (Barr *et al.*, 1989; Ligoxigakis *et al.*, 2013; Rangel *et al.*, 2021; Troncoso y Tiznado, 2014).

The isolation frequency of the main fungi was estimated by calculating the percentage of isolates of each fungus in all the samples collected (number of isolates/n, where n = 144 total of isolates). Likewise, the rate of occurrence of each species of fungus was calculated as the frequency of occurrence of a species in the nine sampling sites. In the present investigation, 144 fungal isolates were obtained from the trunk, petiole, rachis and leaflets of 56 palms (*Phoenix canariensis*) sampled in Mexico City with symptoms of decline and death. Eleven fungal species were identified by morphology per damage category (Table 1).

From the 11 fungal species, four represented 81.9 % of the species isolated from the trunk, petiole, rachis and leaflet, these were considered as the most abundant in the nine sites in which the investigation was carried out (Figure 1), namely: *Alternaria alternata*, with the highest prevalence (34.7 %), followed by *Phoma glomerata*, *Nalanthamala vermoesonii* and *Lasiodiplodia* sp., with 22.9 %, 13.9 % and 10.4 %, respectively. It is worth pointing out that these four species form well-defined groups, that is, those that attack the petiole and rachis, mainly *N. vermoesonii* and *Lasiodiplodia* sp., although *Neopestalotiopsis* sp. and *Phomopsis* sp. were also found, along with those that attack the trunk and leaflets, such as *A. alternata* and *P. glomerata*.

On the other hand, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., and *Serenomyces* sp. displayed a moderate frequency of 2.77, 2.08 and 1.38 %, respectively. *Trichoderma* sp. and *Cladosporium* sp. had a low frequency, with percentages of 1.38-0.69.

presentes en la superficie. Las colonias de hongos desarrolladas se colocaron en cajas petri con medio de cultivo para su caracterización cultural y morfométrica por medio de literatura (Barr *et al.*, 1989; Ligoxigakis *et al.*, 2013; Rangel *et al.*, 2021; Troncoso y Tiznado, 2014).

La frecuencia de aislados de los principales hongos se estimó calculando el porcentaje de cada hongo en todas las muestras recolectadas (número de aislamientos/n, donde n = 144 total de aislados). Asimismo, la tasa de ocurrencia de cada especie de hongo se calculó como la frecuencia de ocurrencia de una especie en los nueve sitios de muestreo. Durante la presente investigación se obtuvieron 144 aislamientos de hongos del tronco, peciolo, raquis y foliolos de las 56 palmeras (*Phoenix canariensis*) muestreadas en la Ciudad de México con presencia de declinamiento y muerte. Se identificaron por morfología 11 especies de hongos por categoría de daño (Cuadro 1).

De las 11 especies de hongos, cuatro representaron el 81.94 % de las especies aisladas de tronco, peciolo, raquis y foliolo, las cuales fueron consideradas como las más abundantes en los nueve sitios donde se desarrolló la investigación (Figura 1), estas fueron: *Alternaria alternata* con mayor prevalencia (34.7 %) seguida de *Phoma glomerata*, *Nalanthamala vermoesonii* y *Lasiodiplodia* sp., con 22.9 %, 13.9 % y 10.4 %, respectivamente. Cabe señalar que estas cuatro especies forman dos grupos bien definidos, es decir, las que atacan peciolo y raquis, principalmente *N. vermoesonii* y *Lasiodiplodia* sp., aunque también se encontró a *Neopestalotiopsis* sp., y *Phomopsis* sp., y los que atacan el tronco y los foliolos como *A. alternata* y *P. glomerata*.

Por otra parte, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., y *Serenomyces* sp., presentaron una frecuencia moderada de 2.77, 2.08 y 1.38 %, respectivamente. *Trichoderma* sp., y *Cladosporium* sp., tuvieron una frecuencia baja con porcentajes de 1.38-0.69.

**Table 1. Fungal species isolated from palms with decline and death in Mexico City by damage category.**  
**Cuadro 1. Especies de hongos aisladas de palmeras con declinamiento y muerte en la Ciudad de México por categoría daño.**

| Categoría de daño         | Especies de hongos aisladas     |                                 |                              |                             |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                           | Peciolo                         | Raquis                          | Foliolo                      | Tronco                      |
| <b>Aparentemente sana</b> | <i>Lasiodiplodia</i> sp.        | <i>Alternaria alternata</i>     | <i>Alternaria alternata</i>  |                             |
|                           | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> | <i>Lasiodiplodia</i> sp.        | <i>Lasiodiplodia</i> sp.     | <i>Alternaria alternata</i> |
|                           | <i>Neopestalotiopsis</i> sp.    | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> | <i>Neopestalotiopsis</i> sp. |                             |
|                           | <i>Phomopsis</i> sp.            | <i>Phoma glomerata</i>          | <i>Phoma glomerata</i>       |                             |
| <b>Inicial</b>            | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> | <i>Alternaria alternata</i>     | <i>Alternaria alternata</i>  | <i>Alternaria alternata</i> |
|                           | <i>Neopestalotiopsis</i> sp.    | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> | <i>Neopestalotiopsis</i> sp. | <i>Fusarium</i> sp.         |
|                           | <i>Penicillium</i> sp.          | <i>Phoma glomerata</i>          | <i>Phoma glomerata</i>       | <i>Phoma glomerata</i>      |
|                           | <i>Phomopsis</i> sp.            | <i>Phomopsis</i> sp.            |                              |                             |
| <b>Intermedia</b>         | <i>Cladosporium</i> sp.         | <i>Alternaria alternata</i>     |                              |                             |
|                           | <i>Lasiodiplodia</i> sp.        | <i>Lasiodiplodia</i> sp.        | <i>Alternaria alternata</i>  | <i>Alternaria alternata</i> |
|                           | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> | <i>Lasiodiplodia</i> sp.     | <i>Phoma glomerata</i>      |
|                           | <i>Neopestalotiopsis</i> sp.    | <i>Phoma glomerata</i>          | <i>Phoma glomerata</i>       | <i>Trichoderma</i> sp.      |
| <b>Avanzada</b>           | <i>Lasiodiplodia</i> sp.        | <i>Alternaria alternata</i>     | <i>Alternaria alternata</i>  |                             |
|                           | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> | <i>Fusarium</i> sp.             | <i>Lasiodiplodia</i> sp.     | <i>Alternaria alternata</i> |
|                           | <i>Phomopsis</i> sp.            | <i>Lasiodiplodia</i> sp.        | <i>Penicillium</i> sp.       | <i>Phoma glomerata</i>      |
|                           | <i>Serenomyces</i> sp.          | <i>Penicillium</i> sp.          | <i>Phoma glomerata</i>       |                             |

The rate of occurrence of each fungal species in each sampling site was variable (Figure 2). According to the relative frequency, SES and AET housed the greatest diversity of fungal species (six species), followed by APP, DSA and PMN (five species); CGC, LGP and ADP (four species), and finally, FER (three species).

*Alternaria alternata* presented a higher occurrence, since it was present in all nine sites, followed by *Phoma glomerata*, found in eight sites; these fungi were isolated mainly from the leaflets. On the other hand, out of the fungi found in petioles and rachis, *N. vermoesenii* had the greatest occurrence, since it was found in seven of the nine sites, followed by *Neopestalotiopsis* sp. (five sites) and *Lasiodiplodia* sp. (three sites).

La tasa de ocurrencia de cada especie de hongo en cada sitio de muestreo fue variable (Figura 2). De acuerdo con la frecuencia relativa, SES y AET albergaron la mayor diversidad de especies de hongos (seis especies); seguido por APP, DSA y PMN (cinco especies); CGC, LGP y ADP (cuatro especies), y finalmente FER (tres especies).

*Alternaria alternata* presentó una mayor ocurrencia ya que estuvo presente en los nueve sitios, seguida de *Phoma glomerata* presente en ocho sitios, estos hongos se aislaron principalmente de los foliolos. Por otra parte, de los hongos presentes en peciolo y raquis, *N. vermoesenii* tuvo la mayor ocurrencia al estar presente en seis de los nueve sitios; seguida de *Neopestalotiopsis* sp. (cinco sitios) y *Lasiodiplodia* sp. (tres sitios).

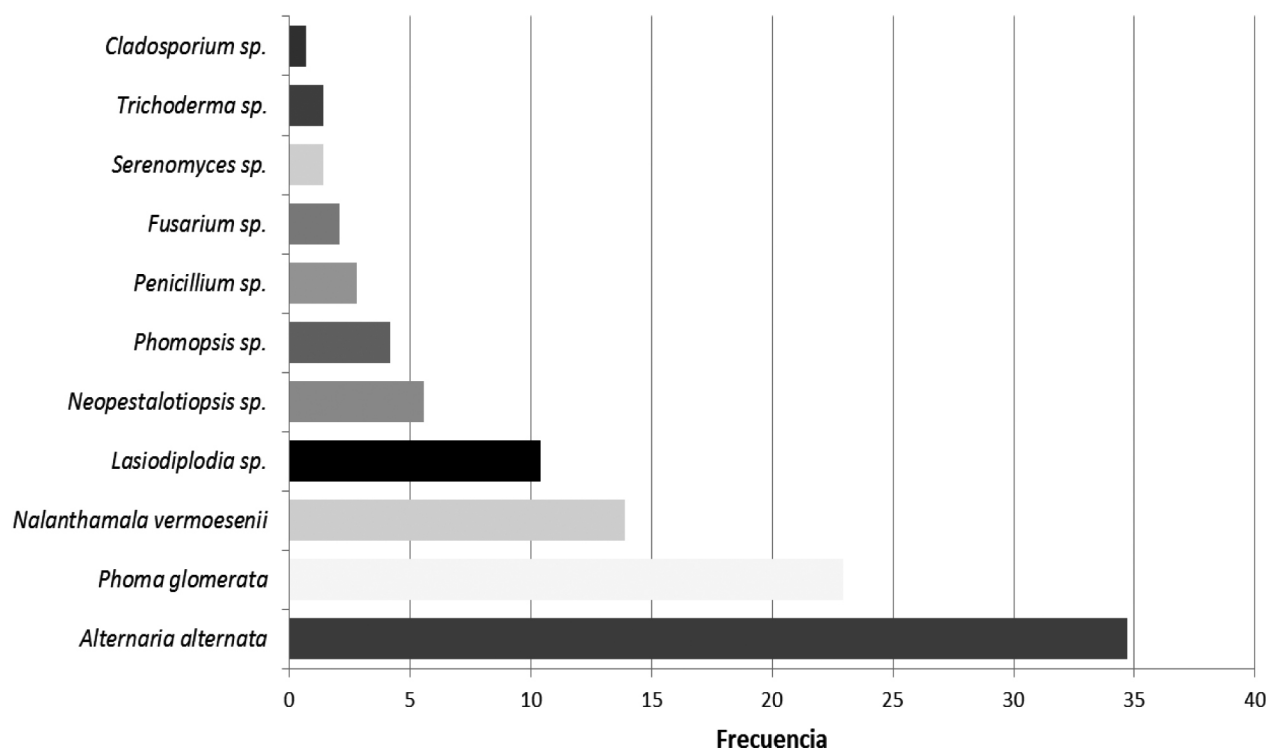


Figure 1. Frequency of fungal species isolated from the trunk, petiole, rachis and leaflet of *Phoenix canariensis* in nine sampling sites in Mexico City.

Figura 1. Frecuencia de especies de hongos aislados de tronco, peciolo, raquis y foliolo de *Phoenix canariensis*, en nueve sitios de muestreo en la Ciudad de México.

Based in the frequency and the number of isolates obtained, *Nalanthamala vermoesenii*, *Lasiodiplodia sp.*, *Neopestalotiopsis sp.*, *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata* and *Serenomyces sp.* were determined as the fungi with the greatest importance in terms of decline and death of palms in Mexico City, although it is worth pointing out that palms displayed one or more fungi, yet they were recognized based on the type of symptom described and the isolate of the fungus. Due to this, the following symptoms are described:

***Nalanthamala vermoesenii*.** The symptoms were the death of leaves, which progresses from the youngest to the oldest; leaves become dark brown. One of the main characteristics was that the leaves remain attached to the palm, but they precipitate

Con base en la frecuencia y número de aislados obtenidos, se determinó que *Nalanthamala vermoesenii*, *Lasiodiplodia sp.*, *Neopestalotiopsis sp.*, *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata* y *Serenomyces sp.*, son los hongos de mayor importancia en el declinamiento y muerte de palmas en la CDMX, cabe aclarar que en las palmas se presentaban uno o más hongos, sin embargo; se reconocieron con base al tipo de síntoma descrito y el aislado del hongo. Por ello se describen los siguientes síntomas:

***Nalanthamala vermoesenii*.** Los síntomas fueron muerte de hojas que progresa desde las más jóvenes hacia las hojas más viejas, las hojas adquieren una coloración café oscuro. Una característica principal fue que las hojas permanecen adheridas a

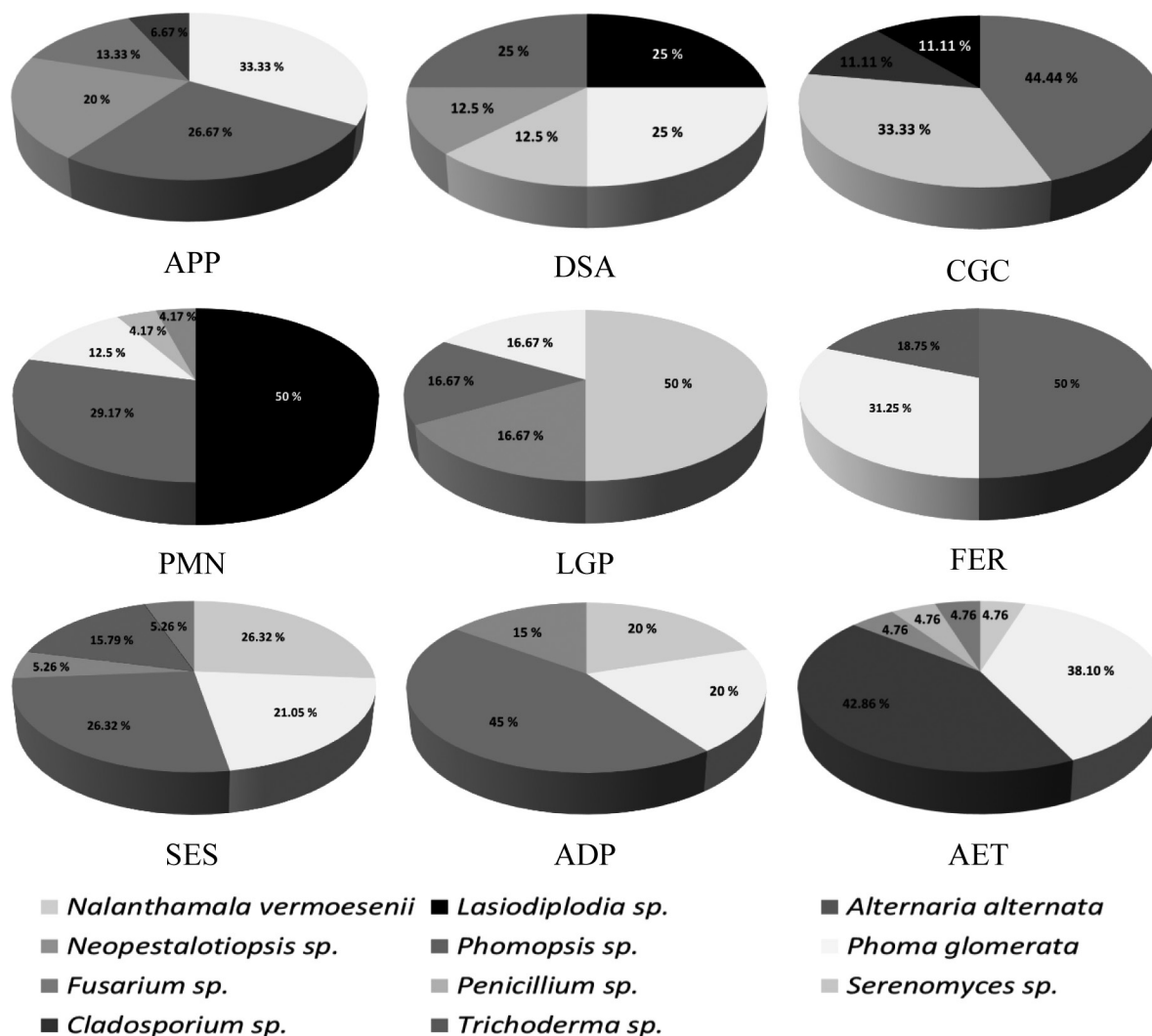


Figure 2. Species of fungi isolated from the trunk, petiole, rachis and leaflets in each sampling site and the percentage of each fungal species in regard to the total species obtained for each site. APP: Avenida Paseo de las Palmas; DSA: Diagonal San Antonio; CGC: Campestre Churubusco Golf Club; PMN: El Papatote Museo del Niño; LGP: La Glorieta de la Palma; FER: Ferrería; SES: Sara, corner with Saúl; ADP: Anselmo de la Portilla; AET: 535 Avenue, corner with Talismán.

Figura 2. Especies de hongos aisladas de tronco, peciolo, raquis y foliolos en cada sitio de muestreo y el porcentaje de cada especie de hongo con respecto al total de especies obtenidas por cada sitio. APP: La Avenida Paseo de las Palmas; DSA: Diagonal San Antonio; CGC: Club de Golf Campestre Churubusco; PMN: El Papatote Museo del Niño; LGP: La Glorieta de la Palma; FER: Ferrería; SES: Sara Esquina Saúl; ADP: Anselmo de la Portilla; AET: Avenida 535 Esquina Talismán.

towards the trunk, taking the shape of a skirt. The fronds display necrotic lesions, defined by a moist margin, which covers from the petiole to the apex of the frond (Figure 3 a). The internal symptoms

la palma, pero se precipitan hacia el tallo tomando la apariencia de una falda. Las frondas presentan lesiones necróticas delimitadas por un margen de consistencia húmeda, que avanza del peciolo hacia

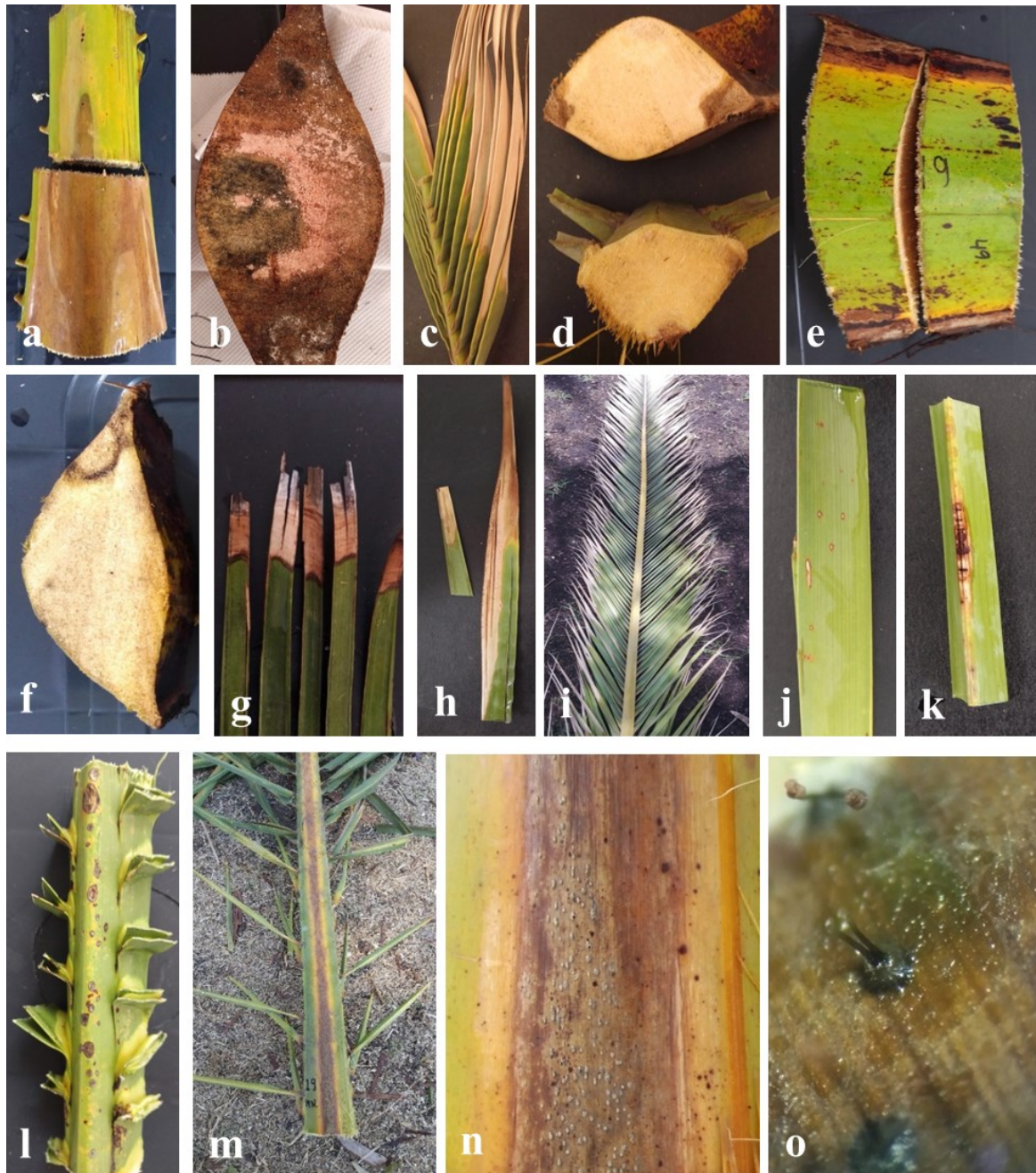


Figure 3. Symptoms and signs of the six main fungi isolated from the petioles, rachis and leaflets of *Phoenix canariensis*. a and b) *Nalanthamala vermoesonii*; c and d) *Lasiodiplodia* sp.; e and f) *Neopestalotiopsis* sp.; g, h and i) *Alternaria alternata*; j, k and l) *Phoma glomerata*; m, n and o) *Serenomyces* sp.

Figura 3. Síntomas y signos de seis principales hongos aislados de peciolo, raquis y foliolos de *Phoenix canariensis*. a y b) *Nalanthamala vermoesonii*; c y d) *Lasiodiplodia* sp.; e y f) *Neopestalotiopsis* sp.; g, h e i) *Alternaria alternata*; j, k y l) *Phoma glomerata*; m, n y o) *Serenomyces* sp.

display a rot in the bud with an unpleasant odor, whereas the petiole and rachis in their initial stages present a dark brown decoloring, as in the case of the bud, and in advanced stages (death of fronds) the decoloring is opaquer. The sign that indicates the presence of pink rot are the abundant salmon- or pink-colored spore masses on the infected tissues (Figure 3 b). In some cases, pink rot causes external symptoms that can be distinguished by the lateral decoloring of the petiole and rachis.

***Lasiodiplodia* sp.** The symptoms were the death of fronds, which progresses from the older to the younger leaves, all of which acquire a pale green to light brown color. The leaves remain attached to the palm, maintaining its natural structure, unlike the palms infected with *N. vermoesenii*. In initial to intermediate symptoms, leaflets present dieback, a symptom known as blight (Figure 3 c) and the transition zone (area between healthy and diseased tissue) presents an olive green to light brown color; in initial stages they presented dark brown areas on the sides (Figure 3 d), whereas in later stages, the color reaches the inner internal tissues, and finally, when the fronds die, they become black. Occasionally, the external part displays light brown stripes that stretch from the petiole to the rachis of the frond.

***Neopestalotiopsis* sp.** The symptoms were observed mainly in the petiole. The external part displays a dark brown color, mainly at the sides of the petiole (Figure 3 e). Regarding internal symptoms, a light brown color appears with a dark brown to black margin (transition zone) (Figure 3 f). As the symptoms progress, the entire internal tissue is affected, and black acervuli develop in the diseased tissue.

***Alternaria alternata*.** The symptoms were dieback of leaflets (from the tip to the base of the leaflet).

el ápice de la fronda (Figura 3 a). Los síntomas internos, manifiestan una pudrición del cogollo con olor desagradable, el peciolo y raquis en etapas iniciales presentan una decoloración de color café oscuro al igual que en el caso del cogollo, en estados avanzados (muerte de frondas) la decoloración es más opaca. El signo indicativo de la presencia de la pudrición rosa, son las abundantes masas de esporas de color salmón o rosa sobre los tejidos infectados (Figura 3 b). En algunos casos la pudrición rosa causa síntomas externos que se distinguen por la decoloración lateral del peciolo y raquis.

***Lasiodiplodia* sp.** Los síntomas fueron, muerte de frondas que progresa desde las más viejas hacia las hojas más jóvenes, adquieren una coloración verde pálido a café claro. Las hojas permanecen adheridas a la palma conservando su estructura natural, a diferencia de las palmeras infectadas con *N. vermoesenii*. En síntomas iniciales a intermedios, los folíolos presentan una muerte descendente (de la punta hacia la base), síntoma conocido como tizón (Figura 3 c) y la zona de avance (margen entre el tejido sano y enfermo) presenta una coloración verde olivo a café claro y de apariencia húmeda. Sus síntomas internos son en el peciolo y raquis, en etapas iniciales presentaron áreas de color café oscuro inicialmente en los lados (Figura 3 d), en estados avanzados la coloración se extiende hacia todos los tejidos internos, finalmente cuando las frondas mueren se presenta una coloración negra. En ocasiones, en la parte externa se presentan líneas de color café claro que van desde el peciolo al raquis de la fronda.

***Neopestalotiopsis* sp.** Los síntomas se observaron principalmente en peciolo. En la parte externa se presenta una coloración café oscuro, esto principalmente a los lados del peciolo (Figura 3 e). Respecto a los síntomas internos, se presenta una



In advanced stages, the symptoms appear as blight, covering the entire leaf, leaflets become light brown (Figure 3 g), in the transition between the healthy and diseased tissue, a darker color appears (Figure 3 h e i), and in this zone over the tissue is where the conidia, characteristic of this pathogen, appear.

***Phoma glomerata***. Symptoms were mainly observed in leaflets and, to a lesser extent, in the rachis. In the leaflets, light brown circular spots surrounded by a dark brown margin (Figure 3 j), whereas in later stages, the lesions grew in size and coalesced, forming longer spots (Figure 3 k). In the rachis, circular spots develop, similar in color to the case of the leaflets (Figure 3 l), and in the lesions, light brown pycnidia are developed.

***Serenomyces sp.*** Symptoms were mainly observed in the petiole and rachis. They begin with slightly sunken, moist-looking spots, bright brown in the center and circumscribed by maroon margins. In later stages, the spots coalesce and form maroon lines, either in the middle part or on the sides of the petiole and rachis (Figure 3 m and n), and on the diseased tissue in a moist chamber, dark brown to black, semi-sunken perithecia develop, with a long neck through which the light brown ascospores are expelled (Figure 3 o).

Little investigation has been carried out on phytopathogenic fungi that affect the Canary Island date palm (*P. canariensis*), despite being a very important ornamental species. Worldwide, this palm species has presented diseases such as pink palm rot, caused by the fungus *Nalanthamala vermoesenii* (syn. *Penicillium vermoesenii*; *Gliocladium vermoesenii*), which is widely distributed in temperate, Mediterranean and subtropical climates in Spain, Egypt, Australia, Belgium, Congo, Czech Republic, India, Japan, New Zealand, Russia, South Africa, the United Kingdom, United States,

decoloración café claro con un margen (zona de avance) de color café oscuro a negro (Figura 3 f), a medida que avanzan los síntomas, la totalidad del tejido interno se ve afectado y en el tejido enfermo se desarrollan acérvulos de color negro.

***Alternaria alternata***. Los síntomas fueron muerte descendente de folíolos (de la punta hacia la base del folíolo), en estados avanzados los síntomas se presentan como atizamiento abarcando la totalidad del área foliar, los folíolos adquieren una coloración café claro (Figura 3 g), en la zona de avance (transición entre el tejido sano y enfermo) se presenta una coloración más oscura (Figura 3 h e i), asimismo, en esta zona sobre el tejido se desarrollan los conidios característicos de este patógeno.

***Phoma glomerata***. Los síntomas se observaron principalmente en folíolos y en menor medida en el raquis. En los folíolos se desarrollan inicialmente manchas circulares de color café claro, delimitadas por un margen marrón a café oscuro (Figura 3 j), en estados avanzados, las lesiones crecen en tamaño y coalescen formando manchas más alargadas (Figura 3 k), en el raquis se desarrollan manchas circulares, similares en coloración que en el caso de los folíolos (Figura 3 l), en las lesiones se desarrollaron picnidios de color café claro.

***Serenomyces sp.*** Los síntomas se observaron principalmente en peciolo y raquis, inician con manchas de apariencia húmeda, poco hundidas, de color café brillante en el centro y delimitadas por márgenes de color marrón. En estados avanzados, las manchas coalescen y forman líneas de color marrón ya sea en la parte media o a los lados del peciolo y raquis (Figura 3 m y n) y en cámara húmeda, sobre el tejido enfermo se desarrollan peritecios seminmersos de color café oscuro a

Greece (Ligoxigakis *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2016).

Likewise, three species of *Fusarium* have been reported: *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*, causal agent of wilting by *Fusarium*, present in France, Italy, Japan, United States, Argentina, Australia, Canary Islands, Greece and Spain (Elena, 2004; Palmucci, 2005; Hernández *et al.*, 2010). *Fusarium proliferatum*, the causal agent of wilting by *Fusarium*, syndrome of sudden decline, present in the Canary Islands and Spain (Hernández *et al.*, 2010). *F. oxysporum* f. sp. *palmarum*, causal agent of wilting by *Fusarium*, lethal death, present mainly in the United States, in the state of Florida (Elliott *et al.*, 2010; Elliott, 2011).

In Mexico, this investigation is the first study focused on the identification of the associated agents with the decline and death of *P. canariensis* palms in Mexico City. The study reveals 11 fungal species via the sampling and diagnosis, as the agents related to the trunk, petiole, rachis and leaflets. *Alternaria alternata* and *Phoma glomerata* were mainly isolated from diseased leaflets, and the former coincides with reports by Maitlo *et al.* (2014), except for the fact that these authors isolated them from *Phoenix dactylifera*. In the case of *Phoma*, other species have been isolated from leaflets such as *Phoma* sp. (Abdullah *et al.*, 2010) and *Phoma ucladium* (Maitlo *et al.*, 2014), as well as in *P. dactylifera*. It is worth pointing out that the present investigation also isolated *A. alternata* and *P. glomerata* from the trunk, which has not been reported by any other author to date. Regarding the fungi that were most frequently isolated from petiole and rachis, that is, *N. vermoesonii*, *Lasiodiplodia* sp., *Neopestalotiopsis* sp., and *Phomopsis* sp., in the case of *N. vermoesonii*, this coincides with reports by Mohamed *et al.* (2016), Ligoxigakis *et al.* (2013), who also isolated this species of petiole and rachis in *P. canariensis*. In regard to *Lasiodiplodia*

negro, con cuello largo por donde son expulsadas las ascosporas de color café claro (Figura 3 o).

Existe poca investigación respecto a los hongos fitopatógenos que afectan a la Palma Canaria (*P. canariensis*) a pesar de ser una especie de gran importancia ornamental. A nivel mundial, en esta especie de palma se han reportado enfermedades como la pudrición rosa de las palmas, causada por el hongo *Nalanthamala vermoesonii* (syn. *Penicillium vermoesonii*; *Gliocladium vermoesonii*) la cual se encuentra ampliamente distribuida en climas templados, mediterráneos y subtropicales en España, Egipto, Australia, Bélgica, Congo, República Checa, India, Japón, Nueva Zelanda, Rusia, Sudáfrica, Reino Unido, Estados Unidos, Grecia (Ligoxigakis *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2016).

Asimismo, se han reportado tres especies de *Fusarium*: *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*, agente causal de la marchitez por *Fusarium*, presente en Francia, Italia, Japón, Estados Unidos, Argentina, Australia, Islas Canarias, Grecia y España (Elena, 2004; Palmucci, 2005; Hernández *et al.*, 2010). *Fusarium proliferatum*, agente causal de la marchitez por *Fusarium*, síndrome del declinamiento súbito, presente en Islas Canarias y España (Hernández *et al.*, 2010). *F. oxysporum* f. sp. *palmarum*, agente causal de la marchitez por *Fusarium*, muerte letal, presente principalmente en Estados Unidos, en el estado de Florida (Elliott *et al.*, 2010; Elliott, 2011).

En México, esta investigación representa el primer estudio enfocado en identificar los agentes asociados al declinamiento y muerte de palmas de *P. canariensis* en la Ciudad de México, el estudio reveló 11 especies de hongos mediante el muestreo y diagnóstico de los agentes asociados a tronco, peciolo, raquis y foliolos. *Alternaria alternata* y *Phoma glomerata* fueron aislados principalmente de foliolos enfermos, en el caso de la primera coincide

sp., our results only coincide with reports by Santos *et al.* (2020), who isolated *L. theobromae* and *L. pseudotheobromae* from rachis (among other tissues) from *Cocos nucifera*. These and other species of this fungus have been isolated from *P. dactylifera* such as *L. hormozganensis* and *L. theobromae* from roots (Al-Hammadi *et al.*, 2019); *L. theobromae* from *P. dactylifera* and *P. hanceana* from unspecified tissue (Farr and Rossman, 2020), from leaves of *Cocos nucifera* (Ramjegathesh *et al.*, 2019) and the pod of the leaf of *P. roebelenii*. In Germany *L. brasiliensis*, *L. euphorbicola*, *L. lodoiceae* and *L. mexicanensis* were found in leaves from Mexico of the palm species *Chamaedorea elegans*, *C. metallica*, *C. seifrizii*, *Dypsis lutescens* and *Lodoicea maldivica* (Douanla and Scharnhorst, 2021). *Neopestalotiopsis* sp. has been reported in oil palm with the species *N. saprofitica* (Ismail *et al.*, 2017).

Out of the least frequently isolated species, it is worth mentioning the presence of *Fusarium* in rachis and trunk, unlike reports by Vergara *et al.* (2023), where the most frequently isolated fungi were *F. incarnatum*, *F. verticillioides* and *F. solani*, and in which the latter was pointed out as the cause of the regressive death of *Phoenix canariensis* in urban areas of Querétaro, Mexico. This fungus is considered one of the most devastating for date palm in the United Arab Emirates (Alwahshi *et al.*, 2019), and it causes different diseases called sudden decline and wilting syndrome from *Fusarium*, attributed to *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. solani*; vascular fusariosis or Bayoud's disease, caused by *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, found in northern Africa, and which caused the death of around two thirds of the date palm plants (Tantaoui *et al.*, 1996); wilting by *Fusarium*, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, is the main cause of disease in *P. canariensis* and other palm species in the Canary

con lo reportado por Maitlo *et al.* (2014), solo que estos autores los aislaron de *Phoenix dactylifera*. En el caso de *Phoma*, otras especies han sido aisladas de foliolos como *Phoma* sp. (Abdullah *et al.*, 2010) y *Phoma ucladium* (Maitlo *et al.*, 2014) también en *P. dactylifera*. Cabe señalar que en la presente investigación también se aisló a *A. alternata* y *P. glomerata* de tronco, lo cual a la fecha no ha sido reportado por otros autores. En el caso de los hongos que se aislaron con mayor frecuencia de peciolo y raquis, esto es, *N. vermoesonii*, *Lasiodiplodia* sp., *Neopestalotiopsis* sp., y *Phomopsis* sp., para el caso de *N. vermoesonii* coincide con lo reportado por Mohamed *et al.* (2016), Ligoxigakis *et al.* (2013) quienes también aislaron a esta especie de peciolo y raquis en *P. canariensis*. En lo que respecta a *Lasiodiplodia* sp., nuestros resultados solo coinciden con lo reportado por Santos *et al.* (2020) quienes aislaron a *L. theobromae* y *L. pseudotheobromae* de raquis (entre otros tejidos), pero de *Cocos nucifera*; estas y otras especies de este hongo han sido aisladas de *P. dactylifera* como *L. hormozganensis* y *L. theobromae* de raíz (Al-Hammadi *et al.*, 2019); *L. theobromae* de *P. dactylifera* y *P. hanceana* sin especificar el tejido (Farr y Rossman, 2020), de hojas de *Cocos nucifera* (Ramjegathesh *et al.*, 2019) y de la vaina de la hoja de *P. roebelenii*. En Alemania se detectó a *L. brasiliensis*, *L. euphorbicola*, *L. lodoiceae* y *L. mexicanensis* en follaje procedente de México de las especies de palma *Chamaedorea elegans*, *C. metallica*, *C. seifrizii*, *Dypsis lutescens* y *Lodoicea maldivica* (Douanla and Scharnhorst, 2021). *Neopestalotiopsis* sp., ha sido reportada en palma de aceite con la especie *N. saprofitica* (Ismail *et al.*, 2017).

De las especies aisladas con menor frecuencia, resulta importante mencionar la presencia de *Fusarium* en raquis y tronco, caso contrario a lo reportado por Vergara *et al.* (2023), donde los

Islands (Hernández *et al.*, 2010). In addition, during this investigation, the identification and *in vitro* planting of *Serenomyces* sp., isolated from the petiole and rachis of *P. canariensis*, becomes important, which coincides with reports by Elliott and Jardin (2006) and Elliott and Jardin (2014), who also isolated this fungus from the petiole and rachis of the same palm species, except in Florida, United States, where it causes the disease known as chlorosis and necrosis of the petiole and rachis. Based on the most frequent fungi, *Nalanthamala vermoesonii* and *Lasiodiplodia* sp. were related to the decline and death of palms in Mexico City, and less frequently, *Neopestalotiopsis* sp., *Serenomyces* sp., *Alternaria alternata* and *Phoma glomerata*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Secretariat of Education, Science, Technology and Innovation (SECTEI) of Mexico City for supporting the project PM214031(893) "Agents Associated to the Decline and Death of Palms in Mexico City". Thanks also go to the Secretariat of the Environment (SEDEMA) of Mexico City, as well as to Ricardo Serrano for the support provided for the field work.

#### LITERATURE CITED

- Abdullah SK, Lopez LLV and Jansson HB. 2010. Diseases of date palms (*Phoenix dactylifera* L.). Basrah Journal for Date Palm Research 9:1-44.
- Al-Hammadi MS, Al-Shariqi R, Maharachchikumbura SSN and Al-Sadi AM. 2019. Molecular identification of fungal pathogens associated with date palm root diseases in the United Arab Emirates. Journal of Plant Pathology 101:141-147. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0089-8>
- Alwahshi K, Saeed E, Sham A, Alblooshi A, Alblooshi M, El-Tarabily K and AbuQamar S. 2019. Molecular identification and disease management of date palm sudden decline syndrome in the United Arab Emirates. International Journal of Molecular Sciences 20(4):923. <https://doi.org/10.3390/ijms20040923>
- Barr ME, Ohr HD, Murphy MK and Barr ME. 1989. The Genus *Serenomyces* on Palms 81(1): 47-51.

hongos de mayor frecuencia aislados fueron *F. incarnatum*, *F. verticillioides* y *F. solani*, señalando este último como causante de la muerte regresiva de *Phoenix canariensis* en áreas urbanas en Querétaro, México. Este hongo es considerado como uno de los más devastadores de la palma datilera en los Emiratos Árabes Unidos (Alwahshi *et al.*, 2019), causa diferentes enfermedades denominadas como: síndrome del declinamiento súbito y marchitez por *Fusarium* atribuidos a *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. solani*; fusariosis vascular o enfermedad de Bayoud, causada por *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, presente en el norte de África y que causó la muerte de alrededor de dos terceras partes de las plantas de palma datilera (Tantaoui *et al.*, 1996); marchitez por *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, es la principal causa de enfermedad en *P. canariensis* y otras especies de palmas en las Islas Canarias (Hernández *et al.*, 2010). También, durante esta investigación, cobra importancia la identificación y cultivo *in vitro* de *Serenomyces* sp., aislado de peciolo y raquis de *P. canariensis*, lo cual coincide con lo reportado por Elliott and Jardin (2006) y Elliott y Jardin (2014) quienes también aislaron a este hongo de peciolo y raquis de la misma especie de palma, solo que, en Florida, Estados Unidos, en donde causa la enfermedad denominada clorosis y necrosis de peciolo y raquis. Se asociaron al declinamiento y muerte de palmeras en la ciudad de México, con base a los hongos de mayor frecuencia a *Nalanthamala vermoesonii* y *Lasiodiplodia* sp., de menor frecuencia *Neopestalotiopsis* sp., *Serenomyces* sp., *Alternaria alternata* y *Phoma glomerata*.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI) por el apoyo al proyecto: PM214031(893)

- Barrow SC. 1998. A Monograph of *Phoenix* L. (Palmae: Coryphoideae). Kew Bulletin 53(3):513-575. <https://doi.org/10.2307/4110478>
- Blair SA, Koeser AK, Knox GW, Roman LA, Thetford M and Hilbert DR. 2019a. Health and establishment of highway plantings in Florida (United States). Urban Forestry and Urban Greening 43:126384.
- Blair SA, Koeser AK, Knox G, Roman LA and Thetfor M. 2019b. Visual health assessment for palms. Urban Forestry and Urban Greening 41: 195-200.
- Bond J. 2012. Urban tree health: a practical and precise estimation method. Urban Forest Analytics. Geneva. NY.
- Douanla MC and Scharnhorst A. 2021. Palm Foliage as Pathways of Pathogenic Botryosphaeriaceae Fungi and Host of New *Lasiodiplodia* Species from Mexico. Pathogens 10:1297. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101297>
- Elena K. 2004. Fusarium wilt of *Phoenix canariensis*: first report in Greece. New Disease Reports 10:31.
- Elliott ML. 2011. First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum* on Canary Island Date Palm in Florida. Plant Disease 95(3):356-356. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-10-0851>
- Elliott ML, Des JEA, O'Donnell K, Geiser DM, Harrison NA and Broschat TK. 2010. *Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum*, a novel forma specialis causing a lethal disease of *Syagrus romanzoffiana* and *Washingtonia robusta* in Florida. Plant Disease 94:31-8.
- Elliott ML and Jardin EAD. 2006. First report of a *Serenomyces* sp. From *Copernicia* × *burretiana*, *Latania loddigesii*, and *Phoenix canariensis* in Florida and the United States. Online. Plant Health Progress. <https://doi.org/10.1094/PHP-2006-1213-02-BR>.
- Farr DF and Rossman AY. 2020. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved November 20th, 2019, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Hernández J, Espino A, Rodríguez RJM, Pérez SA, León M, Abad CP and Armengol J. 2010. Survey of diseases caused by *Fusarium* spp. on palm trees in the Canary Islands. Phytopathologia Mediterranea 49:84-88.
- Ismail SI, Zulperi D and Norddin S. 2017. First Report of *Neopestalotiopsis saprophytica* causing leaf spot of oil palm (*Elaeis guineensis*) in Malaysia S. 0282, 3–6.
- Ligoxigakis EK, Papaioannou IA, Markakis EA and Typas AM. 2013. First report of pink rot of *Phoenix* and *Washingtonia* species caused by *Nalanthamala vermoesenii* in Greece. Plant Disease 97(2):285-285. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-12-0725-PDN>
- Maitlo WA, Markhand GS, Abul SAA, Lodhi AM and Jatoi MA. 2014. Fungi associated with sudden decline disease of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and its incidence at Khairpur, Pakistan. Pakistan Journal of Phytopathology 26:67-73.
- Mohamed HW, Ezzat M, Shaker AR and Abdelwahed SS. 2016. First record and disease management of pink rot in cocos palm trees in Egypt. Der Pharmacia Lettre 8(10):27-31.
- “Agentes Asociados a la declinación y muerte de palmas de la ciudad de México”. A la Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México (SEDEMA) y a Ricardo Serrano, por el apoyo en el trabajo de campo.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Palmucci HE. 2005. *Fusarium oxysporum* causal agent of wilt on crop fields of *Phoenix canariensis* in Buenos Aires Province, Argentina. New Disease Reports 12:5.
- Rafiqi M, Jelonek L, Diouf AM, Mbaye A, Rep M and Diarra A. 2022. Profile of the *in silico* secretome of the palm dieback pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, a fungus that puts natural oases at risk. PLoS ONE 17(5):e0260830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260830>
- Ramjagathesh R, Johnson I, Hubballi M and Maheswarappa HP. 2019. Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* causing leaf blight disease of coconut. Journal of Plantation Crops 47(2):62-71. <https://doi.org/10.25081/jpc.2019.v47.i2.5763>
- Rangel MEA, Paolinelli M, Rolshausen PE, Valenzuela SC ND and Hernández MR. 2021. Characterization of *Lasiodiplodia* species associated with grapevines in Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 60(2): 237–251. <https://doi.org/10.36253/phyto-12576>
- Rivera D, Obón C, Alcaraz F, Egea T, Carreño E, Laguna E, Santos A and Wildpret W. 2013. A review of the nomenclature and typification of the Canary Islands endemic palm, *Phoenix canariensis* (Arecaceae). Taxon 62:1275-1282. <https://doi.org/10.12705/626.17>
- Santos PHD, Carvalho BM, Aredes FAS, Mussi-Dias V, Pinho DB, Pereira MG and da Silveira SF. 2020. Is *Lasiodiplodia theobromae* the only species that causes leaf blight disease in Brazilian coconut palms? Tropical Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00344-x>
- SEDEMA (Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México). 2022. Informa Sedema sobre atención a palmeras de la Ciudad de México. <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/comunicacion/nota/informa-sedema-sobre-atencion-palmeras-de-la-ciudad-de-mexico>
- SEDEMA (Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México). 2021. Sustituye Sedema palmeras muertas en avenida de las Palmas. <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/comunicacion/nota/sustituye-sedema-palmeras-muertas-en-avenida-de-las-palmas>
- Spennemann DHR. 2018. Geographical distribution of four key ornamental and production palm species *Phoenix canariensis*, *P. dactylifera*, *Washingtonia filifera* and *W. robusta*; Institute for Land, Water and Society, Charles Sturt University: Albury, NSW, Australia.
- Tantaoui A, Quinten M, Geiger JP and Fernandez D. 1996. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing Bayoud disease of date

- palm in Morocco. *Phytopathology* 86:787-792. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-787>.
- Troncoso RR, and Tiznado HME. 2014. *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>
- Vergara PS, Landeros JF, Malda BG, Huerta CH, Esquivel NU, Caltzonzin FK and Pacheco AJR. 2023. Associated pathogens to the regressive death of Canary palm (*Phoenix canariensis*) at urban areas of Queretaro, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-4>

# Identification of *Puccinia sherardiana* in *Sphaeralcea angustifolia* in Mexico State

## Identificación de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia* en el Estado de México

Iván Leal-León, <sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrarias, km. 15.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, El Cerrillo Piedras Blancas, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México; Magnolia Moreno-Velázquez, <sup>2</sup>Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Avenida Centenario de la Educación, Colonia Santa Ana, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México, México; <sup>1</sup>Jesús Ricardo Sánchez-Pale; <sup>2</sup>Andrés Quezada-Salinas\*.

\*Corresponding autor: andresqsa79@gmail.com

Received: February 10, 2023.

Accepted: April 11, 2023.

Leal-León I, Moreno-Velázquez M, Sánchez-Pale JR and Quezada-Salinas A. 2023. Identification of *Puccinia sherardiana* in *Sphaeralcea angustifolia* in Mexico State. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 257-267.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-6>

First DOI publication: April 28, 2023.

Primera publicación DOI: 28 de Abril, 2023.

**Abstract.** During the years 2017 and 2018, leaves and stems with dark brown lesions containing hypophilic telia surrounded by chlorotic halos were collected from *Sphaeralcea angustifolia* plants located in Axapusco, State of Mexico. Based on the morphological characteristics, the fungus *Puccinia sherardiana* was identified. Uredinal stage was not detected during the observation period. Verification of the identity of the fungus was carried out by

**Resumen.** Durante los años 2017 y 2018, se recolectaron hojas y tallos con lesiones café oscuras conteniendo telios hipófilos rodeados por halos cloróticos en plantas de *Sphaeralcea angustifolia* localizadas en Axapusco, Estado de México. Con base en las características morfológicas, se identificó al hongo *Puccinia sherardiana*. No se detectó el estado uredinial durante el periodo de observación. La verificación de la identidad del hongo se realizó mediante un análisis filogenético con parte de una secuencia del gen 28S del ADN ribosómico. Se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de *S. angustifolia* mediante la inoculación de teliosporas. Las plantas inoculadas desarrollaron síntomas y signos 15 días después de la inoculación, iniciando con la presencia de ecios errumpentes en la epidermis del hospedante y posteriormente la formación de telios, completando los Postulados de Koch. El hongo *P. sherardiana* se describió previamente como una roya con ciclo de vida microcíclico

means of a phylogenetic analysis with part of a sequence of the 28S gene of ribosomal DNA. Pathogenicity tests were performed on *S. angustifolia* plants by inoculating teliospores. The inoculated plants developed symptoms and signs 15 days after inoculation, beginning with the presence of eruptive aecia in the epidermis of the host and later the formation of telia, completing Koch's Postulates. The fungus *P. sherardiana* was previously described as a rust with a microcyclic life cycle on species of the genera *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* and *Sphaeralcea*, belonging to the Malvaceae family; however, in this study the pathogen behaved differently. *P. sherardiana* will continue to be studied to determine if its life cycle is demicyclic in Mexico.

**Key words:** morphology, pathogenicity test, phylogenetic analysis, rust.

The genus *Sphaeralcea*, which belongs to the Malvaceae family, is comprised of approximately 40 species mainly distributed in the western part of North America. More than half of these species are found in Mexico, with the most representative being *Sphaeralcea angustifolia* Cav. G. Don., commonly known as “vara de San José,” “hierba del negro,” or “tlixihuitl” in the Nahuatl language (Rzedowski and Rzedowski, 2005). This species is widely distributed (McVaugh, 2001). Andrade-Ceto (2009) reports that it has been used for its anti-inflammatory effect in diseases such as tonsillitis, bronchitis, conjunctivitis, rheumatism, bruises, and hemorrhoids. It is also used as a healing agent and for the treatment of gastrointestinal disorders such as diarrhea and dysentery (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Calzada *et al.*, 2017) and osteoarthritis (Romero-Cerecero *et al.*, 2013).

The Pucciniales (Basidiomycota) are a group of fungi that parasitize vascular plants, with complex

sobre especies de los géneros *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* y *Sphaeralcea*, pertenecientes a la familia Malvaceae; sin embargo, en este estudio el patógeno tuvo un comportamiento diferente. Se continuará estudiando a *P. sherardiana* para determinar si en México su ciclo de vida es demicíclico.

**Palabras clave:** morfología, patogenicidad, análisis filogenético, roya.

El género *Sphaeralcea* perteneciente a la familia Malvaceae, está representado por alrededor de 40 especies que se encuentran principalmente en la parte occidental de Norteamérica, y más de 50% se distribuyen en México, la especie más representativa es *Sphaeralcea angustifolia* Cav. G. Don., una planta comúnmente conocida como vara de San José, hierba del negro o tlixihuitl en la lengua náhuatl (Rzedowski y Rzedowski, 2005), la cual se encuentra ampliamente distribuida (McVaugh, 2001). Andrade-Ceto (2009) reporta que ha sido utilizada por su efecto antiinflamatorio en enfermedades como tonsilitis, bronquitis, conjuntivitis, reumatismo, contusiones y hemorroides. También se utiliza como cicatrizante, en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales como diarrea y disentería (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Calzada *et al.*, 2017) y la osteoartritis (Romero-Cerecero *et al.*, 2013).

Los Pucciniales (Basidiomycota) son un orden de hongos parásitos obligados de plantas vasculares, con ciclos de vida complejos y causantes de enfermedades conocidas como royas (Toome-Heller, 2016; Aime *et al.*, 2018). En la actualidad, se estima que existen de 7500 a 8500 especies descritas de Pucciniales siendo el género *Puccinia* el que más pérdidas económicas causa (Toome-Heller, 2016) y el que comprende el mayor número de especies reportadas con aproximadamente 4000. Por lo anterior, y por la alta especificidad con sus hospedantes,



life cycles and causing diseases known as rusts (Toome-Heller, 2016; Aime *et al.*, 2018). There are currently an estimated 7,500 to 8,500 described species of Pucciniales, with the genus *Puccinia* causing the most economic losses (Toome-Heller, 2016) and comprising approximately 4,000 species. Due to their high host specificity, studying their evolution is complicated (Aime *et al.*, 2018). *Puccinia sherardiana* (Horst, 2013; Demers *et al.*, 2015) affects different species of the genera *Sphaeralcea*, *Sidalceae*, *Althaea*, *Malvastrum*, *Alcea* (Malvaceae). This rust is reported as microcyclic (Briere and Franc, 1998; Dugan and Nazaire, 2011) and produces symptoms and signs in the stem and leaves, such as the presence of dark brown telia surrounded by chlorotic halos. These symptoms have been reported in *Sphaeralcea grossulariaefolia*, *S. munroana*, and *Sidalcea malviflora* in the USA (Briere and Franc, 1998; Sampangi *et al.*, 2010). The objectives of this study were to observe the life cycle of *P. sherardiana* in *S. angustifolia*, provide a detailed morphological description of the fungus, and confirm its pathogenicity.

From June to August in 2017 and 2018, *S. angustifolia* plants with sori were collected in the Santa Maria region (19°51'23.60" N, 98°44'57.02" W), Axapusco, State of Mexico. To describe the pathogen morphometrics, spermatia, aeciospores, teliospores, and sections of spermogonia, aecia, and telia were mounted separately in a drop of lactophenol with cotton blue on glass slides for observation under light microscopy. The morphology and size of 50 spores were determined at a magnification of 40X. The surface structures of the aeciospores and teliospores were observed directly using a scanning electron microscope (Carl Zeiss®). Telia and teliospores characteristics were compared with taxonomic keys and descriptions by Hotson (1934) and Arthur (1962).

se complica el estudio de su evolución (Aime *et al.*, 2018). Diferentes especies de los géneros *Sphaeralcea*, *Sidalceae*, *Althaea*, *Malvastrum*, *Alcea* (Malvaceae), son afectadas por *Puccinia sherardiana* (Horst, 2013; Demers *et al.*, 2015), una roya reportada como microcíclica (Briere y Franc, 1998; Dugan y Nazaire, 2011), la cual se caracteriza por producir síntomas y signos tanto en el tallo como en las hojas que consisten de la presencia de telios de color café oscuro, rodeados por halos cloróticos. Estos síntomas se han reportado en *Sphaeralcea grossulariaefolia*, *S. munroana* y *Sidalcea malviflora* en EE. UU. (Briere y Franc, 1998; Sampangi *et al.*, 2010). Los objetivos del presente trabajo fueron observar el ciclo de *P. sherardiana* en *S. angustifolia*, realizar una descripción morfológica detallada del hongo y verificar su patogenicidad.

Durante junio a agosto, en los años 2017 y 2018, se recolectaron plantas de *S. angustifolia* con desarrollo de soros, en la región de Santa María (19°51'23.60" N, 98°44'57.02" O), Axapusco, Estado de México. Para la descripción morfométrica del patógeno, los espermacios, eciosporas y teliosporas, así como secciones de los espermogonios, ecios y telios se montaron por separado en una gota de lactofenol con azul de algodón sobre portaobjetos para su observación en microscopía de luz. Se determinó la morfología y tamaño de 50 esporas a una magnificación de 40X. Las estructuras superficiales de las eciosporas y teliosporas se observaron directamente usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carl Zeiss®). Las características de los telios y teliosporas se compararon con claves taxonómicas y descripciones realizadas previamente por Hotson (1934) y Arthur (1962).

Para confirmar la identidad del hongo, se rasparon eciosporas a partir de un ecio de plantas sintomáticas colectadas en campo, a partir del cual se extrajo el ADN. La calidad del ADN se verificó

To confirm the identity of the fungus, aeciospores were collected from an aecium of symptomatic plants in the field and DNA was extracted from them. The quality of the DNA was verified by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light using an M-26X transilluminator (UVP Ltd®, USA). The identity of the fungus was confirmed by amplifying part of the 28S ribosomal DNA gene (including D1 and D2 domains) using the LR0R and LR6 primers (Vilgalys and Hester, 1990, Aime *et al.*, 2006). Each reaction mixture (50 µL) contained PCR Buffer 1X, 0.02 U µL<sup>-1</sup> of DNA polymerase (Promega®, USA), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.8 Mm of each primer, and 2 ng of template DNA. The PCR was carried out in a Bio-Rad C1000 thermocycler (Bio-Rad Laboratories®, USA) with initial denaturation at 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 90 s, 50 °C for 60 s, 72 °C for 90 s (alignment), followed by a final extension at 72°C for 7 min. The amplified PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen®, USA) and sequenced at Macrogen (Seoul, Korea). Similar sequences deposited in the GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) were obtained using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm. The matrices were compiled using the MEGA 5.0.5 program and analyzed using Bayesian inference criteria. The alignments were performed online using the MAFFT 7 program with E-INS-i and FFT-NS-i strategies and default parameters.

Plants of *S. angustifolia* were propagated under isolated conditions in a greenhouse. The plants were potted in polyethylene bags with a substrate comprised of agrolite, peat, and forest soil in a ratio of 20, 30, and 50%, respectively. The mixture was sterilized in an autoclave at 121 lb three times for 30 minutes each time. At six weeks of age, the plants were inoculated via leaf spray with

mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV usando un transiluminador M-26X (UVP Ltd®, EE. UU.). Se amplificó por PCR parte del gen 28S del ADN ribosómico (incluyendo los dominios D1 y D2) usando los iniciadores LR0R y LR6 (Vilgalys y Hester, 1990, Aime *et al.*, 2006). Cada mezcla de reacción (50 µL) contenía Buffer para PCR 1X, 0.02 U µL<sup>-1</sup> de ADN polimerasa (Promega®, EE. UU.), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.8 Mm de cada iniciador y 2 ng de ADN molde. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad C1000 (Bio-Rad Laboratories®, EE. UU.) usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C por 90 s, 50 °C por 60 s, 72 °C por 90 s (alineamiento), seguido de una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos amplificados de PCR se purificaron usando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen®, EE. UU.), y se secuenciaron en la empresa Macrogen (Seúl, Corea). Se realizaron búsquedas utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para obtener secuencias similares depositadas en el GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las matrices fueron compiladas utilizando el programa MEGA 5.0.5. Los alineamientos fueron realizados en internet utilizando el programa MAFFT 7 mediante las estrategias E-INS-i y FFT-NS-i y los parámetros por defecto. Las matrices fueron analizadas utilizando criterios de inferencia Bayesiana.

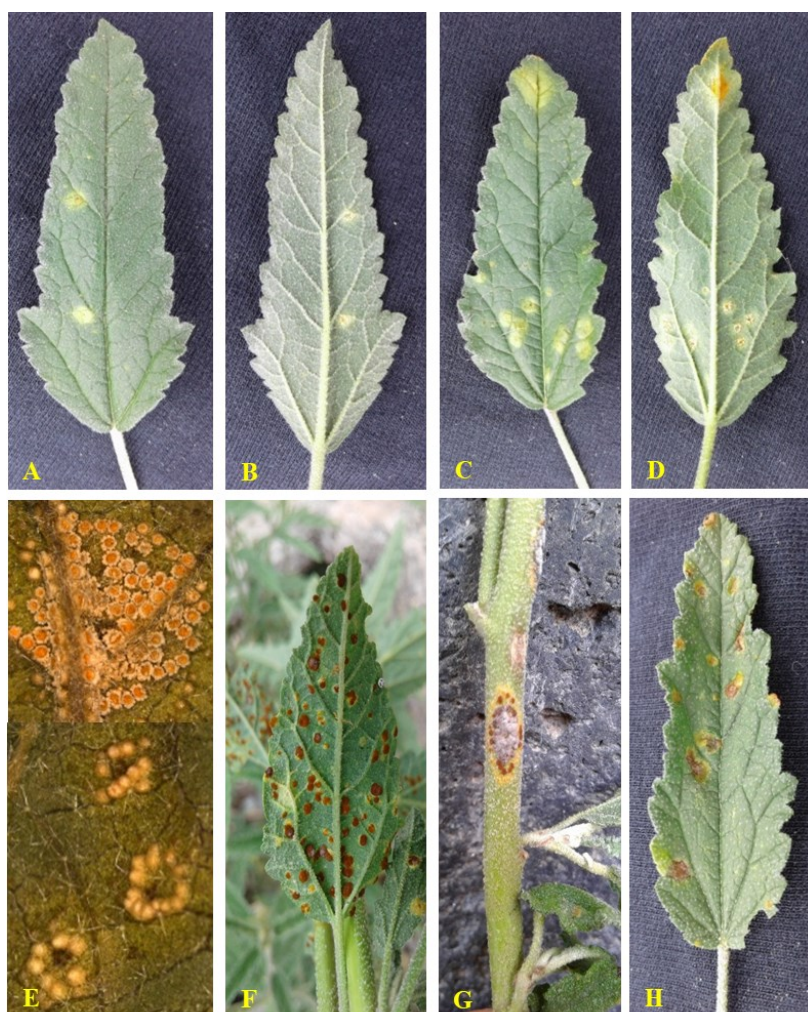
Plantas de *S. angustifolia* se reprodujeron bajo condiciones aisladas en invernadero. Las plantas se colocaron en bolsas de polietileno con sustrato a base de agrolita, turba y tierra de monte en una proporción de 20, 30 y 50%, respectivamente; la mezcla se desinfectó en autoclave a 121 lb tres veces durante 30 min cada vez. Cuando las plantas alcanzaron una edad de seis semanas, las hojas se inocularon mediante aspersión con una suspensión

a suspension of teliospores at a concentration of  $1 \times 10^4$  teliospores  $\text{mL}^{-1}$ , sourced from plants displaying symptoms of the pathogen. Inoculated plants were kept in greenhouse conditions, with an average temperature of 22 °C during the day and 18 °C at night, and relative humidity of 60%. The experiment was replicated twice.

In the field, symptoms began as light green circular spots on both the adaxial and abaxial surfaces of the leaves (Figure 1A and 1B). Small

de teliosporas a una concentración de  $1 \times 10^4$  teliosporas  $\text{mL}^{-1}$ , estas se obtuvieron a partir de plantas con signos del patógeno. Las plantas inoculadas se conservaron bajo condiciones de invernadero (temperatura promedio de 22 °C en el día y 18 °C durante la noche y 60 % de humedad relativa). El ensayo se repitió dos veces.

En campo, los síntomas iniciaron con una decoloración verde claro en forma de manchas circulares que se observaron por ambos lados de la hoja



**Figure 1.** Symptoms and signs induced by *Puccinia sherardiana* in plants of *Sphaeralcea angustifolia*. A, B) Light green circular spots; C, D and E) Development of yellow aecia; F and G) Development of telia on leaf and stem; H) Telia delimited by a chlorotic halo.

**Figura 1.** Síntomas y signos inducidos por *Puccinia sherardiana* en plantas de *Sphaeralcea angustifolia*. A, B) Manchas circulares de color verde claro; C, D y E) Desarrollo de ecios de color amarillo; F y G) Desarrollo de telios en hoja y tallo; H) Telios delimitados por una halo clorótico.

light brown dots subsequently developed in the center of the spots, corresponding to the formation of spermogonia. The spots then progressed to a light yellow color and irregularly increased in size, accompanied by the development of yellow aecia and aeciospores on the abaxial surface (Figure 1C, 1D, and 1E). Telia were then formed (Figure 1F), which gave rise to teliospores. Both telia and teliospores were exclusively observed on the abaxial surface, as well as on the stem (Figure 1G). Telia were surrounded by chlorotic halos, and lesions of brown color delimited by the chlorotic halo were observed on the adaxial surface (Figure 1H).

The pycnia (spermogonia) were found to develop in small groups on opposite sides of the aecium. These structures were epiphyllous, subepidermal, and belonged to the V group type 4 classification (Cummins and Hiratsuka, 2003) light brown, located on opposite sides of the ecium, globose, 120-150  $\mu\text{m}$  in diameter (Figure 2A).

The pycniospores (spermatia) were ellipsoidal to subglobose, hyaline to yellowish, and not septate, measuring  $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ . The aecia were observed to be hypophyllous, cup-shaped, and clustered with a light brown color, measuring 219-230  $\mu\text{m}$  in diameter (Figura 2B, 2C). The aeciospores were oblong to ellipsoidal, finely echinulate,  $16.46 \times 14.38 \mu\text{m}$ , and possessed a hyaline wall  $1.5 \mu\text{m}$  thick, with the inner part appearing light brown or yellowish (Figura 2D). The telia found on stems were hypophyllous, cushion-shaped, verrucose, and regularly confluent, with a reddish-brown to dark brown color. Teliospores appeared mostly ellipsoidal to oblong, bicellular, and contained a central constriction with an apical pore. They averaged  $15 \times 42 \mu\text{m}$  and had smooth, dark brown or brown walls, measuring  $0.5\text{-}1.5 \mu\text{m}$  thick at the sides and  $1.5\text{-}3 \mu\text{m}$  apically (Figura 2E, 2F). The teliospore pedicels were usually yellowish,

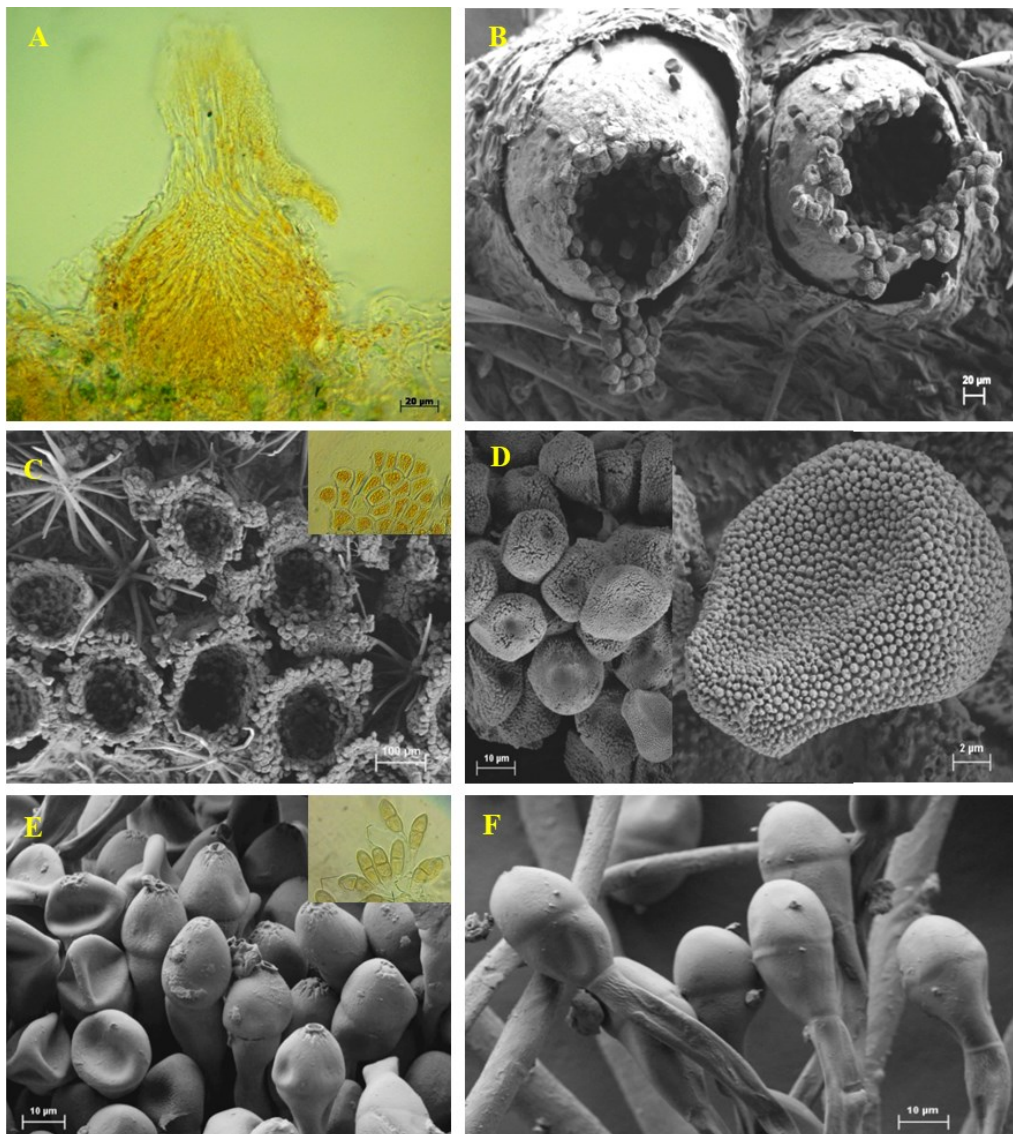
(adaxial y abaxial) (Figura 1A y 1B); en el centro se desarrollaron pequeños puntos de color café claro que correspondieron a la formación de los espermogonios; posteriormente, las manchas se tornaron de color amarillo claro y crecieron en tamaño de forma irregular, en esta etapa en la parte abaxial se observó el desarrollo de ecios y eciosporas de color amarillo (Figura 1C, 1D y 1E). Posteriormente, se formaron los telios (Figura 1F) y estos dieron origen a teliosporas, ambos casos sucedieron únicamente en la parte abaxial, así como en el tallo (Figura 1G); los telios estuvieron delimitados por halos cloróticos, en la parte adaxial se distinguieron lesiones de color café delimitadas por el halo clorótico (Figura 1H).

Los picnios (espermogonios) se desarrollaron en grupos pequeños y fueron epífilos, subepidermales, del grupo V tipo 4 (de acuerdo con la clasificación de Cummins y Hiratsuka, 2003), cafés claros, localizados en lados opuestos del ecio, globosos, de 120-150  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 2A). Las picniosporas (espermacios) fueron hialinos a amarillentos, no septados, elipsoidales a subglobosos, de  $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ . Los ecios fueron hipófilos, cupulados, agrupados, café claro, de 219-230  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 2B, 2C). Las eciosporas fueron oblongas a elipsoidales, finamente equinuladas, de  $16.46 \times 14.38 \mu\text{m}$ , con pared hialina de  $1.5 \mu\text{m}$  de grosor, pero con la parte interior café claro o amarillento (Figura 2D). Los telios sobre tallos fueron hipófilos, pulvinados, verrucosos, regularmente confluentes, café rojizo a café oscuro. Las teliosporas se presentaron en grupos, mayormente elipsoidales a oblongas, con una constricción central, bicelulares, con poro apical, de tamaño promedio de  $15 \times 42 \mu\text{m}$ , lisa, café oscuro a café, con pared de  $0.5\text{-}1.5 \mu\text{m}$  de grosor a los lados y  $1.5\text{-}3 \mu\text{m}$  apicalmente (Figura 2E, 2F). Los pedicelos de las teliosporas usualmente fueron amarillentas, persistentes, de 105  $\mu\text{m}$  de longitud y con paredes lisas de  $1.5 \mu\text{m}$  de grosor. Basados en

persistent, 105  $\mu\text{m}$  long, and had smooth walls 1.5  $\mu\text{m}$  thick. *Puccinia sherardiana* was identified as the rust based on morphological characteristics of the teliospores, according to previous studies (Arthur, 1962; Dugan and Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). The observation period did not reveal the uredinial state.

características morfológicas de las teliosporas, la roya se identificó como *Puccinia sherardiana* (Arthur, 1962; Dugan y Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). El estado uredinial no se presentó durante el periodo de observaciones.

Los síntomas y signos foliares se observaron a los 15 días después de la inoculación en invernadero,



**Figure 2.** Reproductive structures of *Puccinia sherardiana* as seen by light microscopy (A) and scanning electron microscopy (B-F). A) Longitudinal section of a spermatogonium. B-C) Eciospores. D) Eciosporas. E-F) Teliosporas.

**Figura 2.** Estructuras de reproducción de *Puccinia sherardiana* vistas en microscopía de luz (A) y microscopía electrónica de barrido (B-F). A) Corte longitudinal de un espermogonio. B-C) Ecios. D) Eciosporas. E-F) Teliosporas.

Symptoms and signs on leaves were observed 15 days after greenhouse inoculation. Ecia were observed in formation at this time, which subsequently gave rise to eciospores after rupturing the leaf epidermis. The formation of telia and teliospores was observed five days later. The characteristics of the teliospores were observed and confirmed to be consistent with those of *P. sherardiana*, completing Koch's Postulates.

The sequence generated in this study was deposited in the GenBank database under accession number MN967778.1. Phylogenetic analysis was conducted using the partial sequence of the 28S gene and the Bayesian inference criterion. The analysis showed a posterior probability value of 0.99 with sequences of *P. sherardiana* isolates BPI871783 and BPI102198 (Figure 3).

*Puccinia sherardiana* has been reported infecting various species within the family Malvaceae in the United States (Arizona, California, Colorado, Nevada, Oregon, Washington, Idaho, Nebraska, New Mexico, Texas, Utah, Wyoming, Montana, and North Dakota) infecting different species of the genera *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* and *Sphaeralcea*, within the family of the family Malvaceae (Arthur, 1962; Briere and Franc, 1998; Dugan and Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). In Mexico, the presence of *P. sherardiana* was reported by Arthur (1962), but information about the collection site or host was not provided. Demers *et al.* (2015) identified this rust in two specimens (origin unknown) of *Sphaeralcea* sp. intercepted in El Paso, Texas, from goods entering from the border with Mexico. Morphometrically, teliospore characteristics of *P. sherardiana* identified on *S. angustifolia* were similar to those reported by Arthur (1962), Briere and Franc (1998), Dugan and Nazaire (2011), and Demers *et al.* (2015), but differences were found in this study. The teliospores were narrower (15.8  $\mu\text{m}$ ) than the size reported

tiempo en el cual se presentaron ecios en formación, los cuales posteriormente dieron origen a la formación de eciosporas, después de romper la epidermis de la hoja. Cinco días después se observó la formación de telios y teliosporas, estas últimas fueron observadas para completar los Postulados de Koch, sus características correspondieron con las observadas previamente para el caso de *P. sherardiana*.

La secuencia generada en este estudio se depositó en la base del GenBank con número de acceso MN967778.1. El análisis filogenético generado con la secuencia parcial del gen 28S y usando el criterio de inferencia Bayesiana mostró un valor de 0.99 de probabilidad posterior con secuencias de los aislados BPI871783 y BPI102198 de *P. sherardiana* (Figura 3).

*Puccinia sherardiana* se ha reportado en los EE. UU. (Arizona, California, Colorado, Nevada, Oregón, Washington, Idaho, Nebraska, Nuevo México, Texas, Utah, Wyoming, Montana y North Dakota) infectando diferentes especies de los géneros *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* y *Sphaeralcea*, dentro de la familia Malvaceae (Arthur, 1962; Briere y Franc, 1998; Dugan y Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). En el caso de México, Arthur (1962) mencionó que *P. sherardiana* está presente en el país; sin embargo, no se proporcionaron datos del sitio de colecta ni del hospedante; por su parte Demers *et al.* (2015), identificaron a esta roya en dos especímenes (de origen desconocido) de *Sphaeralcea* sp., en intercepciones realizadas en El Paso, Texas, en mercancía que entraba por la frontera de México. En lo que respecta a la morfometría, las características de las teliosporas de *P. sherardiana* identificadas sobre *S. angustifolia* fueron similares a las reportadas por Arthur (1962), Briere y Franc (1998), Dugan y Nazaire (2011) y Demers *et al.* (2015). Sin embargo, en este estudio se presentaron diferencias, por ejemplo, las teliosporas fueron

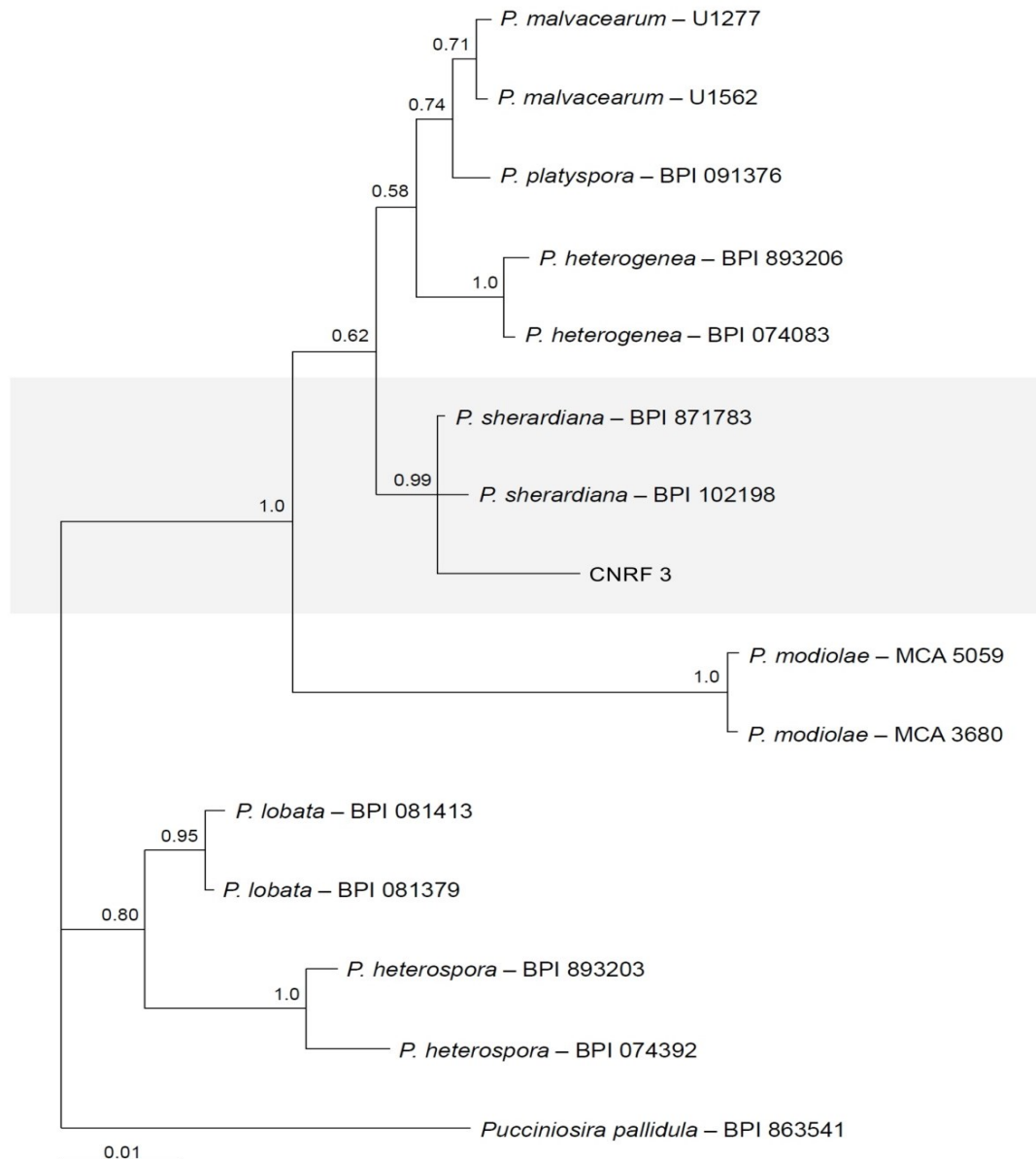


Figure 3. Bayesian tree generated from alignment of partial 28S gene sequences of *Puccinia* species. Bayesian posterior probability values above 0.50 are shown at the nodes. *Puccinosira pallidula* isolate BPI863541 was used as an outgroup.

Figura 3. Árbol Bayesiano generado a partir de alineamiento de secuencias parciales del gen 28S de especies de *Puccinia*. Los valores de probabilidad posterior Bayesianos arriba de 0.50 se muestran en los nodos. El aislado BPI863541 de *Puccinosira pallidula* se usó como grupo externo.

(27-30  $\mu\text{m}$ ) by previously mentioned authors for different hosts, such as 30.85  $\mu\text{m}$  in *Sphaeralcea grossulariaefolia* and *S. munroana*, 21-25  $\mu\text{m}$  in *Sidalcea malviflora*, and 18-30  $\mu\text{m}$  in *Alcea rosea*. Briere and Franc (1998) reported the presence of telia on both sides of the leaf in *S. grossulariaefolia* and *S. munroana*. Dugan and Nazaire (2011) observed telia primarily on the adaxial side of leaves of *Sidalcea malviflora*, whereas in this study, they were only found on the abaxial side. Under greenhouse conditions, foliar symptoms were successfully reproduced by inoculating six-week-old *S. angustifolia* plants with *P. sherardiana* teliospores for a period of 15 days, with an average temperature of 22 °C during the day and 18 °C at night. Briere and Franc (1998) completed Koch's postulates in a period of 13 days using 8-week-old plants and temperatures of 20 °C and 15 °C during the day and night, respectively. This work provides the first description of the morphometric characteristics of the pycnia and pycniospores and reports the aecial phase, along with a description of the aecia and aeciospores. It presents the first evidence for a possible reclassification of *P. sherardiana* as a demicyclic rust, rather than microcyclic, as previously reported by Arthur (1962), Briere and Franc (1998), and Dugan and Nazaire (2011), which stated that the rust lacked the aecial and uredinial phases. However, it is still unknown whether it does or does not present the uredinial part.

## CONCLUSIONS

*P. sherardiana* is reported for the first time in Axapusco, State of Mexico. Based on pathogenicity tests, it has been demonstrated that healthy plants inoculated with this rust can develop symptoms and signs similar to those observed in the initial phase. The present study aims to provide insights

más angostas (15.8  $\mu\text{m}$ ), respecto al tamaño reportado (27–30  $\mu\text{m}$ ) por los autores anteriormente mencionados en diferentes hospedantes, 30.85  $\mu\text{m}$  en *Sphaeralcea grossulariaefolia* y *S. munroana*, 21–25  $\mu\text{m}$  en *Sidalcea malviflora*, y de 18–30  $\mu\text{m}$  en *Alcea rosea*. Con respecto al desarrollo de telios, Briere y Franc (1998) reportaron que están presentes en ambos lados de la hoja en *S. grossulariaefolia* y *S. munroana*. Por su parte, Dugan y Nazaire (2011) observaron telios principalmente en la parte adaxial de hojas de *Sidalcea malviflora*, mientras que en este estudio solo se presentaron en la parte abaxial. Los síntomas foliares son factibles de reproducir mediante la inoculación de plantas de *S. angustifolia* de seis semanas de edad con teliosporas de *P. sherardiana* en condiciones de invernadero y en un período de 15 días con temperatura promedio de 22 °C en el día y 18 °C durante la noche. Por su parte, Briere y Franc (1998) completaron los postulados de Koch en un período de tiempo de 13 días al utilizar plantas de 8 semanas de edad y temperatura de 20 y 15 °C durante el día y noche, respectivamente. Es importante mencionar que en este trabajo se describen por primera vez las características morfométricas de los picnios y picniosporas y se reporta la fase ecial con la respectiva descripción de los ecios y eciosporas, con lo cual se presentan las primeras evidencias para una posible reclasificación de *P. sherardiana* como una roya demicíclica y no microcíclica como se ha reportado anteriormente por Arthur (1962), Briere y Franc (1998) y Dugan y Nazaire (2011) al mencionar que la roya carece de la fase ecial y uredinial. Sin embargo, aún se desconoce si presenta o no la parte uredinal.

## CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez a *P. sherardiana* en Axapusco, Estado de México. Las pruebas de



into the life cycle of *P. sherardiana*, specifically focusing on the various stages involved in infecting *Sphaeralcea angustifolia*.

## CITED LITERATURE

- Aime MC, Bell CD and Wilson AW. 2018. Deconstructing the evolutionary complexity between rust fungi (Pucciniales) and their plant hosts. *Studies in Mycology* 89: 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.002>
- Aime MC, Matheny PB, Henk DA, Frieders EM, Nilsson RH, Piepenbring M, McLaughlin DJ, Szabo LJ, Begerow D, Sampaio JP, Bauer R, Weiss M, Oberwinkler F and Hibbett D. 2006. An overview of the higher-level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia* 98: 896-905. <https://www.jstor.org/stable/20444779>
- Andrade-Cetto A. 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.008>
- Arthur JC. 1962. Manual of the rusts in United States and Canada, with supplement by Cummins GB. New York: Hafner Publishing Co. 438 p. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19631100420>
- Briere SC and Franc GD. 1998. First report of leaf and stem rust caused by *Puccinia sherardiana* on *Sphaeralcea grossulariaefolia* in North America and *S. munroana* in Wyoming. *Plant Disease* 82: 831. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.7.831A>
- Calzada F, Basurto JC, Barbosa E, Velázquez C, Hernández NG, Ordoñez-Razo RM, Luna DM and Mulia LY. 2017. Antiprotozoal activities of tiliroside and other compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Pharmacognosy Research* 9: 133-137. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204644>
- Cummins GB and Hiratsuka Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. Third ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, APS Press, St. Paul, MN. 225 p.
- Demers JE, Romberg MK and Castlebury LA. 2015. Microcyclic rusts of hollyhock (*Alcea rosea*). *International Mycological Association Fungus* 6: 477-482. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.11>
- Dugan FM and Nazaire M. 2011. First report of rust of *Sidalcea malviflora* (dwarf checkerbloom) caused by *Puccinia sherardiana* in Washington State. *North American Fungi* 6: 1-5. <https://doi.org/10.2509/naf2011.006.015>
- García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Siordia G, Jimenez-Arellanes MA, Chávez-Soto MA and Meckes-Fischer M. 2012. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11: 468-477. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85624131008.pdf>
- Horst R. 2013. Host Plants. In: Westcott's Plant Disease Handbook. Springer, Dordrecht. 447-699 pp. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2141-8>
- Hotson JW. 1934. Key to the rusts of the Pacific Northwest. University of Washington Publications in Biology 3. University of Washington Press, Seattle. 193 p.
- McVaugh R. 2001. Ochnaceae to Loasaceae. In: Anderson WR (ed.). Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, Vol. 3. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Romero-Cerecero O, Meckes-Fischer M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer JE, Nicasio-Torres P, Pérez-García D and Tortoriello J. 2013. Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. *Journal of Ethnopharmacology* 147: 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.040>
- Rzedowski GC de and Rzedowski J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. 1406 p.
- Sampangi R, Aime MC, Mohan K and Shock C. 2010. New and re-emerging rust diseases from Idaho and Oregon. *Phytopathology* 100: S113.
- Toome-Heller M. 2016. Latest Developments in the Research of Rust Fungi and Their Allies (Pucciniomycotina). In: Li DW, ed. *Biology of Microfungi, Fungal Biology*. Springer Publishing Switzerland. 147-168 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_7)
- 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. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>

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

# Isolation and identification of antagonistic fungi of fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico

## Aislamiento e identificación de hongos antagonistas de hongos asociados a la marchitez del chile en el sur de Guanajuato, México

**Talina Olivia Martínez-Martínez**, <sup>1</sup>Programa de Investigación en Inocuidad de Alimentos. Campo Experimental Bajío-INIFAP. km 6.5 carretera San Miguel de Allende-Celaya, Celaya, Gto. C.P. 38110, México; **Adriana Paola Martínez-Camacho**, Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato. km 1.2 carretera Valle-Huanímaro, Valle de Santiago, Gto. C.P. 38407, México; **Raúl Rodríguez-Guerra**, Programa de Sanidad Vegetal. Campo Experimental General Terán-INIFAP. km 31 carretera Montemorelos-China, Ex Hacienda Las Anacuas, General Terán, N.L. C.P. 67400, México; <sup>1</sup>**Luis Antonio Mariscal-Amaro; Patricia Rivas-Valencia\***, Programa de Investigación en Sanidad Vegetal. Campo Experimental Valle de México-INIFAP. km 13.5 carretera Los Reyes-Textcoco, Coatlinchan, Textcoco, Edo. Méx., C.P. 56250, México.

\* Corresponding autor: [rivas.patricia@inifap.gob.mx](mailto:rivas.patricia@inifap.gob.mx).

Received: 10 February, 2023

Accepted: 24 April, 2023

Martínez-Martínez TO, Martínez-Camacho AP, Rodríguez-Guerra R, Mariscal-Amaro LA and Rivas-Valencia P. 2023. Isolation and identification of antagonistic fungi of fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(2): 268-284.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-1>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

**Abstract.** The chili crop (*Capsicum annuum*) in Mexico represents an important economic source; however, every year there are losses in production of 40 to 100% due to the root disease known as wilt, which causes premature death of plants, this disease is caused by the fungi complex formed

**Resumen.** El cultivo de chile (*Capsicum annuum*) en México representa una fuente importante de ingresos; sin embargo, cada año se presentan pérdidas en la producción entre el 40 y 100% por la enfermedad conocida como marchitez. Esta enfermedad provoca la muerte prematura de plantas ocasionada por el complejo formado por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Phytophthora capsici*. El objetivo de esta investigación fue aislar hongos antagonísticos a patógenos asociados a la marchitez del chile a partir de muestras de suelo obtenidas en el sur de Guanajuato, México. Se aislaron hongos con potencial antagónico a *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. Se identificaron tres hongos con actividad antagónica constante, inhibiendo el crecimiento micelial, entre el 41-83%. La identificación molecular de los antagonistas se realizó amplificando las regiones in-

by *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Phytophthora capsici*. The objective of this research was to isolate antagonistic fungi to the pathogens causing wilt from soil samples obtained in the southern of the state of Guanajuato, Mexico. Antagonistic fungi potential against *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. and *Phytophthora* spp. were isolated. Then three fungi isolates presented antagonistic potential, inhibiting mycelial growth by 41 to 83%. Molecular identification of the antagonist fungi was performed by amplifying the intergenic transcriptional regions (ITS) of the 18S ribosomal DNA component of fungi. This research contributes to the study of biological control of root pathogens using beneficial native microorganisms present in crop soils affected by pathogens associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico.

**Keywords:** Growth inhibition, beneficial microorganisms, root pathogens.

In 2021, chili pepper (*Capsicum annuum*) production in Mexico reached 3,086,742 t, valued at 30,642.66 million pesos (SIAP, 2022). Despite this, various root diseases have been affecting chili pepper yields in recent years, resulting in wilting and premature plant death (Pérez-Acevedo, 2017). Depending on chili genotypes, environmental conditions, pathogenicity of the pathogens, and inoculum quantity in the soil, wilting can cause losses of 40 to 100% in chili pepper cultivation (Tembhurne *et al.*, 2017). This disease complex is caused by *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, and *Phytophthora capsici* (Montero-Tavera *et al.*, 2013), which lead to wilting, premature leaf drop, chlorosis, necrosis, strangulation at the stem base, and soft, watery rot due to vascular bundle obstruction (Pérez-Acevedo,

tergénicas transcripcionales (ITS) del componente ADN 18S ribosomal, identificando los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Esta investigación contribuye al estudio de alternativas de control biológico de patógenos de raíz, empleando microorganismos nativos presentes en suelos de cultivo afectados por la marchitez del chile en el sur de Guanajuato, México.

**Palabras clave:** Inhibición de crecimiento, microorganismos benéficos, patógenos de raíz.

La producción de chile (*Capsicum annuum*) en México en 2021 generó una producción de 3,086,742 t con un valor de producción de 30,642.66 millones de pesos (SIAP, 2022). No obstante, en los últimos años el rendimiento de esta hortaliza ha sido afectado por diversas enfermedades, principalmente de raíz, que provoca síntomas de marchitez y muerte prematura de la planta (Pérez-Acevedo, 2017). Se estima que la marchitez puede causar pérdidas en el cultivo del chile del 40 al 100%, esto dependerá de los genotipos de chile, las condiciones ambientales, la patogenicidad de los patógenos y la cantidad de inóculo en el suelo (Tembhurne *et al.*, 2017). De acuerdo con diversos autores, esta enfermedad es ocasionada por un complejo formado por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Phytophthora capsici* (Montero-Tavera *et al.*, 2013). Este complejo causa marchitamiento y caída prematura de las hojas, clorosis, necrosis y estrangulamiento en la base del tallo, pudrición suave y acuosa, estos síntomas se presentan debido a la obstrucción de los haces vasculares (Pérez-Acevedo, 2017). Además, del daño causado por *P. capsici*, como la pérdida de turgencia y amarillamiento de hojas, necrosis en la base del tallo y muerte de planta en menos de 25 días (Gómez-Hernández *et al.*, 2018; Pérez-Acevedo

2017). *P. capsici* can cause loss of turgidity, yellowing leaves, necrosis at the stem base, and plant death in under 25 days (Gómez-Hernández *et al.*, 2018; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). *Fusarium* spp. causes leaf discoloration and curling, followed by total wilting due to damage to the vascular system and interruption of physiological processes (Morid *et al.*, 2012). During the first days of seedling growth, the association of *Rhizoctonia* sp. and *Phytium* sp. leads to wilting, chlorosis, necrosis at the stem base, epidermis fall, and plant death (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017).

Crop management practices for these pathogens, including agrochemical application, control of soil moisture, and cultural practices (González-Chavira *et al.*, 2009). However, in recent years, studies have focused on biological control to reduce agrochemical use, protect consumer health, and minimize environmental impact (Zhao *et al.*, 2021). Bacteria, actinomycetes, and mycoparasitic fungi are the most commonly used microorganisms for controlling *P. capsici*, *R. solani*, and *F. oxysporum* (Yadav *et al.*, 2021). These biological control agents occur naturally in the soil microbiota, where they can persist in a microscopic mix of thousands and millions of microorganisms per gram of soil (Ezziyani *et al.*, 2004). The importance of biological control relies significantly on native microorganism species, which can function as antagonists through antibiosis, competition for space or nutrients, direct interactions with the pathogen (mycoparasitism and enzymatic lysis), and induction of resistance.

Due to the economic significance of chili cultivation in Guanajuato, Mexico, the objective of this study was to isolate antagonistic fungi from soil samples collected in production areas located in the southern region of the state, with the purpose of determining their effectiveness against fungi associated with chili wilt. By conducting

*et al.*, 2017). De acuerdo con Morid *et al.* (2012) la sintomatología causada por *Fusarium* spp. es la decoloración y enrollamiento de las hojas, seguido del marchitamiento total de la planta causado por el daño al sistema vascular y la interrupción de los procesos fisiológicos para la producción. Durante los primeros días de crecimiento de plántulas se ha determinado la asociación de *Rhizoctonia* sp. y *Phytium* sp. (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017), causando marchitez, clorosis, seguido de necrosis en la base del tallo, caída de epidermis y por último la muerte de la planta.

Para el manejo de estos patógenos, se realiza diferentes prácticas de manejo del cultivo como la aplicación de agroquímicos, control de humedad del suelo y prácticas culturales (González-Chavira *et al.*, 2009). En los últimos años se han desarrollado estudios enfocados en el control biológico con el fin de reducir la aplicación de agroquímicos, además de salvaguardar la salud del consumidor y reducir el impacto al medio ambiente (Zhao *et al.*, 2021). Los microorganismos más utilizados para el control de *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum* son bacterias, actinomicetos y hongos micoparásitos (Yadav *et al.*, 2021). Estos agentes de control biológico se encuentran de forma natural en la microbiota del suelo, donde pueden persistir en una mezcla microscópica de miles y millones de ellos por cada gramo de suelo (Ezziyani *et al.*, 2004). La importancia del control biológico depende en gran medida de las especies nativas de microorganismos que pueden funcionar como antagonistas a través de la antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.

Dada la importancia económica del cultivo de chile en Guanajuato, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar hongos antagónicos a partir de muestras de suelo obtenidas en áreas de producción

this investigation, valuable local information is provided for the biological control of wilt-causing fungi.

In July 2017, fungi and oomycetes associated with chili wilt were isolated from three plots of San Luis cv. poblano chili plants at the Bajío Experimental Field of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP). Five plants displaying symptoms of wilt, stem rot, stunting, thick stem, and shoot death selected from each plot, placed in polyethylene bags inside a cooler, and transported to the laboratory for processing. Soil collections were carried out during the OI-2018 and PV-2019 cycles in 25 locations across eight chili-producing municipalities in Guanajuato, where plants in vegetative growth with characteristic symptoms of wilt, stem rot, chlorosis, and stunting were recorded. It was observed in both cycles that no agronomic management was implemented, including soil disinfection before planting; poor weed control, and waterlogging caused by uneven terrain or leaks from the irrigation tape. Five soil subsamples were taken from around the chili plants at a depth of 15-20 cm and homogenized to obtain a composite sample of 500 g (Table 1).

To process the wilted plants, we removed their aerial parts, preserved the stem, root collar, and root, and made 1 cm<sup>2</sup> tissue cuts. The cuts were disinfected with 5% sodium hypochlorite for 30 s and washed twice with sterile water. We placed the tissue on Potato Dextrose Agar (PDA) medium and incubated it at 25 °C. After five to seven days, we observed mycelial growth and isolated the colonies that developed. We identified all strains of interest according to their morphological characteristics (Sneh *et al.*, 1991; Van der Plaats-Niterink, 1981; Barnett and Hunter, 1972). To purify the strains, we re-isolated them on PDA using hypha tips (*Rhizoctonia* sp., *Phytium* sp., and *Phytophthora*

del sur de Guanajuato, México, para determinar su efecto contra hongos asociados a la marchitez de chile. Con este estudio se aporta información local para el control biológico de los hongos causantes de la marchitez.

En julio de 2017 se aislaron hongos y oomicetos asociados a la marchitez en plantas de chile poblano cv. San Luis cultivada en tres parcelas del Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se seleccionaron cinco plantas de cada parcela que presentaban marchitez, pudrición de tallo, achaparramiento, tallo grueso y muerte de brotes, se colocaron en una hielera en bolsas de polietileno hasta su traslado al laboratorio para su procesamiento. Durante el ciclo OI-2018 y PV-2019 se realizaron colectas de suelo en 25 localidades de ocho municipios productores de chile en Guanajuato. Se registraron plantas en crecimiento vegetativo con síntomas característicos de marchitez: pudrición en tallo, clorosis y enanismo. En ambos ciclos se constató que no se realizó un manejo agronómico (nula desinfección previa a la siembra del suelo, deficiente control de malezas y encharcamientos causados por el terreno mal nivelado o por fugas de agua de la cinta de riego). Se tomaron cinco submuestras de suelo de alrededor de las plantas de chile a una profundidad de 15-20 cm, estas se homogenizaron para obtener una muestra compuesta de 500 g (Cuadro 1).

Las plantas con síntomas de marchitez se procesaron de la siguiente manera: se eliminó la parte aérea de las plantas, se conservó el tallo, cuello de raíz y raíz, y se realizaron cortes de 1 cm<sup>2</sup> de tejido, mismos que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por 30 s y dos lavados con agua estéril. El tejido se colocó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 25°C y se observó el crecimiento de micelio durante cinco a siete días. Una vez que se desarrollaron las colonias se procedió a

**Table 1. Soil and chili bell pepper plant collection sites for isolation of antagonistic organisms associated with chili wilt in southern Guanajuato. Sampling cycles, Fall-Winter 2018 and Spring-Summer 2019.**

**Cuadro 1. Sitios de colecta de suelo y plantas de chile para el aislamiento de organismos antagónicos asociados a la marchitez del chile en el sur de Guanajuato. Ciclos de muestreo, Otoño-Invierno 2018 y Primavera Verano 2019.**

| Municipio       | Localidad               | Coordenadas geográficas | Variedades de chile por unidad de producción |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|
| <b>O-I/2018</b> |                         |                         |                                              |
| Celaya          | Rancho "Estrada"        | 20.530793; -100.869292  | Crusadier, Aristóteles                       |
| Irapuato        | Cuarta Brigada          | 20.623832; -101.275164  | Crusadier, Aristóteles                       |
| Irapuato        | Rancho "Los Lobos"      | 20.592263; -101.31285   | Crusadier; Aristóteles                       |
| Villagrán       | Rancho "El Pintor"      | 20.514751 -100.944374   | Imperial                                     |
| Silao           | Loma Bonita             | 20.992519; -101.507566  | Húngaro                                      |
| Silao           | Rancho "Santa Faustina" | 20.887298; -101.435176  | Secuoya, Estrella                            |
| Romita          | Fracción Puerta Grande  | 20.88635; -101.495124   | Don Vicente                                  |
| Pénjamo         | Rancho "Buenos Aires"   | 20.381657; -101.834033  | Arista                                       |
| Pénjamo         | Rancho "San Gabriel"    | 20.429055; -101.598688  | 5807                                         |
| Abasolo         | Rancho "El Palomar"     | 20.413018; -101.556484  | 5807                                         |
| <b>P-V/2019</b> |                         |                         |                                              |
| Cortazar        | Rancho "Las Fuentes"    | 20.447392; -100.969701  | Serrano                                      |
| Villagrán       | Rancho "La Charca"      | 20.500479; -101.026391  | Bravo                                        |
|                 | Villagrán               | 20.490822; -101.027278  | Serrano                                      |
| J. Rosas        | Santiago Cuenda         | 20.599575; -101.002517  | Serrano                                      |
|                 | En nombre de Dios       | 20.548681; -101.549556  | Serrano                                      |
| Abasolo         | La Galera               | 20.441680; -101.569290  | Serrano                                      |
|                 | Rancho 1                | 20.450681; -101.595814  | Serrano                                      |
|                 | Rancho "El Pitayo"      | 20.470594; -101.575088  | Tajín                                        |
| Pénjamo         | Rancho "Buenos Aires"   | 20.386537; -101.837438  | Jalapeño                                     |
| Guanajuato      | San José de Llanos      | 20.845623; -101.315313  | Jalapeño                                     |
|                 | Rancho "Santa Faustina" | 20.889908; -101.438975  | Pimiento                                     |
|                 | Parcela junto RSF       | 20.924923; -101.433522  | Pimiento                                     |
| Silao           | Rancho de Elisa         | 20.935769; -101.435210  | Pimiento                                     |
|                 | El Ranchito             | 20.893356; -101.488338  | Jalapeño                                     |
| Romita          | La Aldea                | 20.898463; -101.481889  | Serrano                                      |

sp.) and single conidial cultures (*Fusarium* sp. and *Alternaria* sp.).

The soil samples underwent serial dilutions ( $10^1$ - $10^7$ ), with 1 g of sieved soil sample taken and saline solution (0.8% NaCl) used as the diluent. After homogenization in a Genius® vortex for 1 minute, 500 µL of dilutions  $10^3$ ,  $10^5$ , and  $10^7$  were cultivated in triplicate on Potato Dextrose Agar (PDA) and Luria Agar (LA) by surface spreading, resulting in 18 culture plates per sample. The plates

su aislamiento. Todas las cepas de interés se identificaron de acuerdo con sus características morfológicas (Sneh *et al.*, 1991; Van der Plaats-Niterink, 1981; Barnett y Hunter, 1972). Para la purificación de cepas se hicieron re aislamientos en PDA mediante punta de hifa (*Rhizoctonia* sp., *Phytium* sp. y *Phytophthora* sp.) y cultivos monoconidiales (*Fusarium* sp. y *Alternaria* sp.).

Las muestras de suelo se procesaron mediante diluciones seriadas ( $10^1$ - $10^7$ ), se tomó 1 g de muestra

were then incubated at 25°C for 72 h. Fungi that grew on the culture media were re-isolated on PDA and identified at the genus level based on their macroscopic and microscopic characteristics, including size, color, type of mycelium, and colony shape, as well as hyphae, mycelium, conidia, and conidiophores. Colonies with similar morphological characteristics were discarded, and those with slow growth were eliminated. Monosporic cultures were used to obtain pure strains. To pre-select fungi with possible antagonistic capacity, dual confrontations with *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. were performed. Four points were marked on a PDA culture plate, separated by 1.7 cm, and the candidate antagonist microorganism was seeded at the first point (approximately 1 cm from the edge of the plate), with the remaining three points seeded with the fungus. Possible antagonists were seeded three days prior to the confrontation to give them an advantage in growth. The incubation was carried out at 25°C for five days. The confrontations were performed in triplicate, using 12 culture plates and control. To determine the percentage of radial growth inhibition (PRGI), the growth radius of *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. was measured, and the formula used by Suárez *et al.* (2008) was employed to calculate the PRGI:

$$PRGI = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Where R1: radius of the fungus associated with wilt (control) and R2: radius of the fungus associated with wilt against the antagonist.

The fungi with a PRGI greater than 50% and an antagonistic effect against the confronted fungi were selected. To conduct this test, a PDA medium disk with *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and

de suelo tamizado, como diluyente se empleó solución salina (NaCl 0.8 %). Todas las diluciones se homogenizaron en un vortex Genius<sup>®</sup> por 1 minuto. Se tomaron 500 µL de las diluciones 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>7</sup> y se sembraron por triplicado en medio PDA y Agar Luria (AL) por extensión en superficie, con un total de 18 cajas de cultivo por muestra, que se incubaron a 25°C por 72 h, los hongos que crecieron en los medios de cultivo se re aislaron en medio PDA y se identificaron a nivel género considerando sus características macroscópicas y microscópicas, tales como tamaño, color, tipo de micelio y forma de las colonias; además de hifas, micelio, conidios y conidióforos. Las colonias que presentaban características morfológicas similares fueron descartadas y se eliminaron aquellas con crecimiento lento. Para la obtención de cepas puras se realizaron cultivos monospóricos. Los hongos con posible capacidad antagónica, se sometieron a una preselección a través de confrontaciones duales con *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. En cajas de medio PDA se marcaron en línea cuatro puntos separados por 1.7 cm; en el primer punto (aprox. a 1 cm del borde de la caja) se sembró el microorganismo antagonista candidato y en los tres puntos restantes se sembró el hongo. Los posibles antagonistas se sembraron con tres días de anticipación a la confrontación, con la finalidad de dar ventaja a su crecimiento. La incubación se desarrolló a 25°C durante cinco días. Las confrontaciones se hicieron por triplicado, se emplearon 12 cajas de cultivo y un testigo. Se midió el radio de crecimiento de *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Para el cálculo del PICR se empleó la fórmula utilizada por Suárez *et al.* (2008):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

*Rhizoctonia* spp. mycelium was placed 1 cm from the edge of the Petri dish, and the antagonist fungus was placed at the other end (Correa *et al.*, 2007). Ten repetitions were carried out for this test. The growth diameters of the fungi associated with wilt were measured at 120 hours. The radial growth of *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. in the absence of the antagonist was determined as a control. The PRGI was determined using the formula proposed by Suárez *et al.* (2008). Additionally, the degree of antagonism of the selected isolates was determined using the scale of Bell *et al.* (1982), which classifies the area that the antagonistic organism colonizes in the presence of the phytopathogen into six categories. The PRGI in the pre-selection and dual cultures were analyzed using a factorial design of two factors: antagonist (11 levels) and pathogen (3 levels). The data were transformed using the arcsine function and subjected to analysis of variance and mean comparison. The R version 1.1.1717 software, PBC, was used for the statistical analysis.

DNA extraction from 15-day-old fungal strains was performed using the protocol described by Lievens *et al.* (2003). Genomic DNA was quantified at a wavelength of 260 nm using the Nanodrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific®), and its integrity was verified by electrophoresis on 1% agarose gels. All DNA samples were diluted to concentration of 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . The internal transcribed spacer (ITS) region of the fungal 18S ribosomal DNA component was amplified using the primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTG-CGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), as described by White *et al.* (1990). The expected final PCR product was 650 bp. The PCR product was purified using the ZR DNA Sequencing Cleanup Kit™ D4050S following the manufacturer's protocol. Sequencing was performed at the Genomic Services Department of Langebio, CINVESTAV-

Donde R1: radio del hongo asociados a la marchitez (testigo) y R2: radio del hongo asociados a la marchitez frente al antagonista.

Se eligieron los hongos que presentaron PICR mayor a 50%, además de que tuvieran efecto antagónico frente a los hongos confrontados, esta prueba consistió en colocar a 1 cm del borde de la caja petri un disco de medio PDA con micelio de *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. en el otro extremo el hongo antagonista (Correa *et al.*, 2007). En esta prueba se emplearon 10 repeticiones. Los diámetros de crecimiento de los hongos asociados a la marchitez se midieron a las 120 h. Para el testigo se determinó el crecimiento radial de *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. en ausencia del antagonista, el PICR se determinó con la fórmula utilizada por Suárez *et al.* (2008). Adicionalmente, se determinó el grado de antagonismo de los aislados seleccionados según la escala de Bell *et al.* (1982), que indica en seis clases el área que coloniza el organismo antagónico en presencia del fitopatógeno. Los PICR en la preselección y en los cultivos duales se establecieron bajo un diseño factorial de dos factores: antagonista (11 niveles) y patógeno (3 niveles). Los datos se transformaron con la función arcoseno para realizar un análisis de varianza y comparación de medias. Se empleó el software R versión 1.1.1717, PBC.

Para la identificación molecular de los hongos se utilizó en la extracción de ADN el protocolo de Lievens *et al.* (2003) a partir de cepas de 15 días. El ADN genómico se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific®) a una longitud de onda de 260 nm, y su integridad se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Todas las muestras de ADN fueron diluidas a 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Se realizó la amplificación de la región espaciador interno (ITS) del componente ADN 18S ribosomal de hongos, con los iniciadores descritos



Campus Irapuato, and the obtained information was analyzed using the Finch TV program (Version 1.4.0) and compared against the BLAST: Basic Local Alignment Search Tool database.

Microorganisms associated with chili wilt were identified in the collected samples, with *Fusarium* spp. being the most prevalent, followed by *Rhizoctonia* spp. and *Phytophthora* spp. In addition, the presence of *Pythium* spp. and *Alternaria* spp. was also observed. Table 2 presents the observed symptoms in the collected plants along with the corresponding fungus or oomycete identified.

por White *et al.* (1990) ITS1 (5'TCCGTAGGTGACCTG- CGG3') y ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). El producto de PCR final esperado fue de 650 pb. La purificación del producto de PCR se realizó con el kit ZR DNA Sequencing Cleanup Kit™ D4050S según el protocolo del fabricante. La secuenciación se realizó en el Departamento de Servicios Genómicos del Langebio, CINVESTAV-Campus Irapuato. La información se analizó con el programa Finch TV, Versión 1.4.0. y comparada en la base de datos del BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

**Table 2. Isolates of fungi and oomycetes associated with chili wilt in symptomatic plants collected in southern Guanajuato, Mexico.**

**Cuadro 2. Aislados de hongos y oomicetos asociados a la marchitez del chile en plantas sintomáticas colectadas en el sur de Guanajuato, México.**

| Síntoma                              | Tejido muestreado           | Hongo aislado                          |
|--------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|
| Marchitez de planta, achaparramiento | Raíz, tallo                 | <i>Rhizoctonia</i> spp. (binucleada)   |
| Marchitez de planta, achaparramiento | Raíz, tallo                 | <i>Rhizoctonia</i> spp. (mono nuclear) |
| Muerte de brote                      | Raíz, tallo                 | <i>Rhizoctonia</i> spp. (binucleada)   |
| Muerte de brote                      | Raíz                        | <i>Pythium</i> spp.                    |
| Muerte de brote                      | Raíz, tallo, cuello de raíz | <i>Fusarium</i> spp.                   |
| Muerte de brote                      | Raíz                        | <i>Alternaria</i> spp.                 |
| Muerte de brote                      | Raíz                        | <i>Alternaria</i> spp.                 |
| Tallo grueso                         | Tallo                       | <i>Alternaria</i> spp.                 |
| Marchitez                            | Raíz, tallo, cuello de raíz | <i>Phytophthora</i> spp.               |

In total, 120 fungi with potential antagonistic activity were isolated and screened for pre-selection as antagonistic agents based on their morphology and growth rate, resulting in the selection of 11 strains. The analysis of variance revealed a significant interaction between the two factors (Table 3) at a significance level of 0.001. H5P1 exhibited the highest inhibitory effect against *Phytophthora* spp. (80.12%), whereas HMZA (80.1%) and H6P2 (82.41%) showed similar inhibitory effects against *Fusarium* spp. for *Rhizoctonia* spp., both HMZA (80.6%) and H6P2 (81.69%) showed the

Los microorganismos asociados a la marchitez del chile presentes en las muestras fueron *Fusarium* spp., seguido de *Rhizoctonia* spp. y *Phytophthora* spp.; sin embargo, también se observó la presencia de *Pythium* spp. y *Alternaria* spp. En el Cuadro 2 se indica la sintomatología observadas en las plantas colectadas y el hongo u oomiceto que se asoció.

Adicionalmente, se obtuvieron 120 hongos con posible actividad antagonista; con la determinación de morfología y velocidad de crecimiento, se eligieron a 11 de ellos para emplearlos en la preselección como agentes antagonistas. El análisis de

**Table 3. Percentage of Radial Growth Inhibition (PRGI %) of pre-selected strains of fungal isolates with antagonistic potential for fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico.**

**Cuadro 3. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR %) de las cepas preseleccionadas de hongos aislados con potencial antagónico para hongos asociados a la marchitez del chile en el sur de Guanajuato, México.**

| Hongo | Hongos antagonistas |                     |                     |                   |                    |                      |                      |                      |                      |                     |                     |
|-------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|       | HMZA                | H4P5                | H4C12               | H5P1              | H6P2               | H11P                 | H13P                 | H14P                 | H14P3                | H20P                | H22P                |
| Phy   | 71.4 ± 2.4<br>cde   | 31.45 ± 1.6<br>nopq | 55.58 ± 0.5<br>f    | 80.12 ± 1.9<br>ab | 75.38 ± 1.4<br>bcd | 25.58 ± 2.3<br>pqr   | 50.04 ± 2.3<br>fghi  | 25.14 ± 1.8<br>gr    | 29.48 ± 4.4<br>nopq  | 27.55 ± 2.1<br>opqr | 25.46 ± 2.0<br>pqr  |
| Fus   | 80.1 ± 1.1<br>ab    | 20.72 ± 1.5<br>rs   | 43.94 ± 1.8<br>ghij | 66.67 ± 1.2<br>e  | 82.41 ± 1.3<br>a   | 35.86 ± 2.2<br>jklmn | 35.94 ± 1.1<br>jklmn | 50.44 ± 2.0<br>fgh   | 33.49 ± 2.5<br>lmnop | 52.41 ± 2.6<br>fg   | 52.81 ± 1.8<br>f    |
| Rhi   | 80.6 ± 1.2<br>ab    | 42.33 ± 2.2<br>hijk | 30.76 ± 0.9<br>nopq | 77.71 ± 0.9<br>bc | 81.69 ± 2.3<br>a   | 16.47 ± 3.9<br>s     | 41.57 ± 3.6<br>ijkl  | 35.22 ± 3.5<br>klmno | 57.23 ± 7.4<br>f     | 53.13 ± 5.0<br>f    | 40.08 ± 2.6<br>jklm |

Phy: *Phytophthora* spp., Fus: *Fusarium* spp., Rhi: *Rhizoctonia* spp. Note: Equal letters do not present significant statistical differences ( $p < 0.001$ ). Values correspond to the mean and  $\pm$  standard deviation. / Phy: *Phytophthora* spp., Fus: *Fusarium* spp., Rhi: *Rhizoctonia* spp. Nota: Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). Los valores corresponden a la media y  $\pm$  desviación estándar.

highest inhibitions. The lowest PRGI was observed for the confrontation of *Rhizoctonia* spp. against H11P (16.44%). Therefore, strains H5P1, H6P2, and HMZA were selected due to their consistent antagonistic potential with PRGI in the range of 50 to 82% and were identified at the molecular level.

The ITS1 and ITS4 primers were used for amplification, resulting in amplicons of approximately 650 bp, which are characteristic of fungal isolates (White *et al.*, 1990). Following sequencing and gene comparison using BLAST, the isolates were identified with 100% homology. *Aspergillus flavus* (H5P1), *Penicillium* sp. (H6P2), and *Trichoderma harzianum* (HMZA) were identified as the antagonistic fungi (GenBank accession no. KM386418.1, KP131554.1, KJ598874.1, respectively). The average PRGI of the antagonist strains against *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp. was observed to be 50-82% (Table 4). An interaction was found between the levels of antagonist and pathogen at a significance level of 0.001. Under the dual confrontation technique, similar behavior was observed, where *A. flavus* (79.72%) and

varianza mostró interacción entre los dos factores a un nivel de significancia de 0.001 (Cuadro 3). El mayor efecto inhibitorio para *Phytophthora* spp. se observó con H5P1 (80.12%). Para *Fusarium* spp. se tuvieron dos resultados similares con HMZA (80.1%) y H6P2 (82.41%). En el caso de *Rhizoctonia* spp., tanto HMZA (80.6%) y H6P2 (81.69%) mantuvieron las mayores inhibiciones. El menor PICR se obtuvo con la confrontación de *Rhizoctonia* spp. contra H11P (16.44%). Por lo anterior se seleccionaron a las cepas H5P1, H6P2 y HMZA debido a que mostraron constante potencial antagónico con PICR en un intervalo de 50 a 82% y se identificaron a nivel molecular.

La amplificación con los iniciadores ITS1 e ITS4 mostraron amplicones de aproximadamente 650 pb, característicos de aislados fúngicos (White *et al.*, 1990). Con la secuenciación y comparación de genes del BLAST se logró la identificación de los aislados con homología del 100%. Los hongos antagónicos identificados fueron *Aspergillus flavus* (H5P1), *Penicillium* sp. (H6P2) y *Trichoderma harzianum* (HMZA). (No. de acceso GeneBank KM386418.1, KP131554.1, KJ598874.1,

**Table 4. Percentage of radial growth inhibition (PRGI) of antagonistic fungi isolated against fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico.****Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de hongos antagonísticos aislados contra hongos asociados a la marchitez de chile en el sur de Guanajuato, México.**

| Hongo                    | <i>T. harzianum</i> | <i>A. flavus</i> | <i>Penicillium</i> sp. |
|--------------------------|---------------------|------------------|------------------------|
| <i>Phytophthora</i> spp. | 70.19 ± 2.03 cd     | 79.72 ± 2.06 ab  | 75.30 ± 2.55 bc        |
| <i>Fusarium</i> spp.     | 82.55 ± 1.29 a      | 66.83 ± 11.69 de | 50.77 ± 2.89 g         |
| <i>Rhizoctonia</i> spp.  | 80.36 ± 1.59 ab     | 59.18 ± 2.01 f   | 62.59 ± 2.00 ef        |

Note: Equal letters do not present significant statistical differences ( $p < 0.001$ ). Values correspond to the mean and  $\pm$  standard deviation. / Nota: Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). Los valores corresponden a la media y  $\pm$  desviación estándar.

*Penicillium* sp. (75.30%) showed greater inhibition of radial growth of *Phytophthora* spp., while *T. harzianum* exhibited higher inhibition against *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia* spp. (82.55% and 80.36%, respectively). The lowest inhibition percentages were observed in the confrontation of *Fusarium* spp. against *Penicillium* sp. (50.77%) and *Rhizoctonia* spp. against *Aspergillus flavus*.

Additionally, it was determined that the obtained antagonism belonged to class 2 and 3 according to Bell *et al.*'s (1982) classification system (Table 5). Class 2 antagonism covered two-

respectivamente). En cuanto a la capacidad de inhibición de las cepas los hongos antagonistas contra *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., se observó un PICR promedio de 50 a 82% (Cuadro 4). Se encontró interacción entre los niveles del antagonista y de los patógenos con un nivel de significancia de 0.001. Se observó un comportamiento similar bajo la técnica de confrontación dual, la inhibición del crecimiento radial de *Phytophthora* spp. fue mayor cuando se confrontó con *A. flavus* (79.72%) y *Penicillium* sp. (75.30%); *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. presentaron

**Table 5. Antagonism class according to Bell *et al.* (1982) of *T. harzianum*, *A. flavus* and *Penicillium* sp. vs fungi associated with chili wilt.****Cuadro 5. Clase de antagonismo según Bell *et al.* (1982) de *T. harzianum*, *A. flavus* y *Penicillium* sp. vs hongos asociados a la marchitez del chile.**

| Hongo antagonista            | Hongo                    | Clase de antagonismo |
|------------------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>Trichoderma harzianum</i> | <i>Phytophthora</i> spp. | 2                    |
|                              | <i>Fusarium</i> spp.     | 2                    |
|                              | <i>Rhizoctonia</i> spp.  | 3                    |
| <i>Aspergillus flavus</i>    | <i>Phytophthora</i> spp. | 2                    |
|                              | <i>Fusarium</i> spp.     | 2                    |
|                              | <i>Rhizoctonia</i> spp.  | 2                    |
| <i>Penicillium</i> sp.       | <i>Phytophthora</i> spp. | 3                    |
|                              | <i>Fusarium</i> spp.     | 2                    |
|                              | <i>Rhizoctonia</i> spp.  | 3                    |

thirds of the pathogen's growth area, while class 3 was characterized by the antagonistic agent and pathogen colonizing half of the surface each. Class 3 antagonism was observed in the confrontations of *Penicillium* sp. against *Phytophthora* spp. and *Rhizoctonia* spp., and *T. harzianum* against *Rhizoctonia* spp., as depicted in Figure 1.

The fungi recovered from plants exhibiting wilt symptoms are consistent with those reported by researchers such as Gómez-Hernández *et al.* (2018), Albañil-Juárez *et al.* (2015), and Velásquez-Valle *et al.* (2013), who linked the disease to *P. capsici*, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., and *Pythium* sp. *Alternaria* sp was found in the roots of plants that displayed shoot death, although this pathogen is not always detected in chili wilt. Vásquez-López *et al.* (2009) identified *Alternaria* in symptomatic plants, but they could not accurately determine its pathogenicity. Meanwhile, Garibaldi *et al.* (2019) and Begum *et al.* (2010) demonstrated that *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuis* caused symptoms and even severe damage to the production. Albañil-Juárez *et al.* (2015) reported that *F. oxysporum* had the highest incidence, followed by *Rhizoctonia* sp. and *Phytophthora* sp., in the Bajío and southwest of Guanajuato.

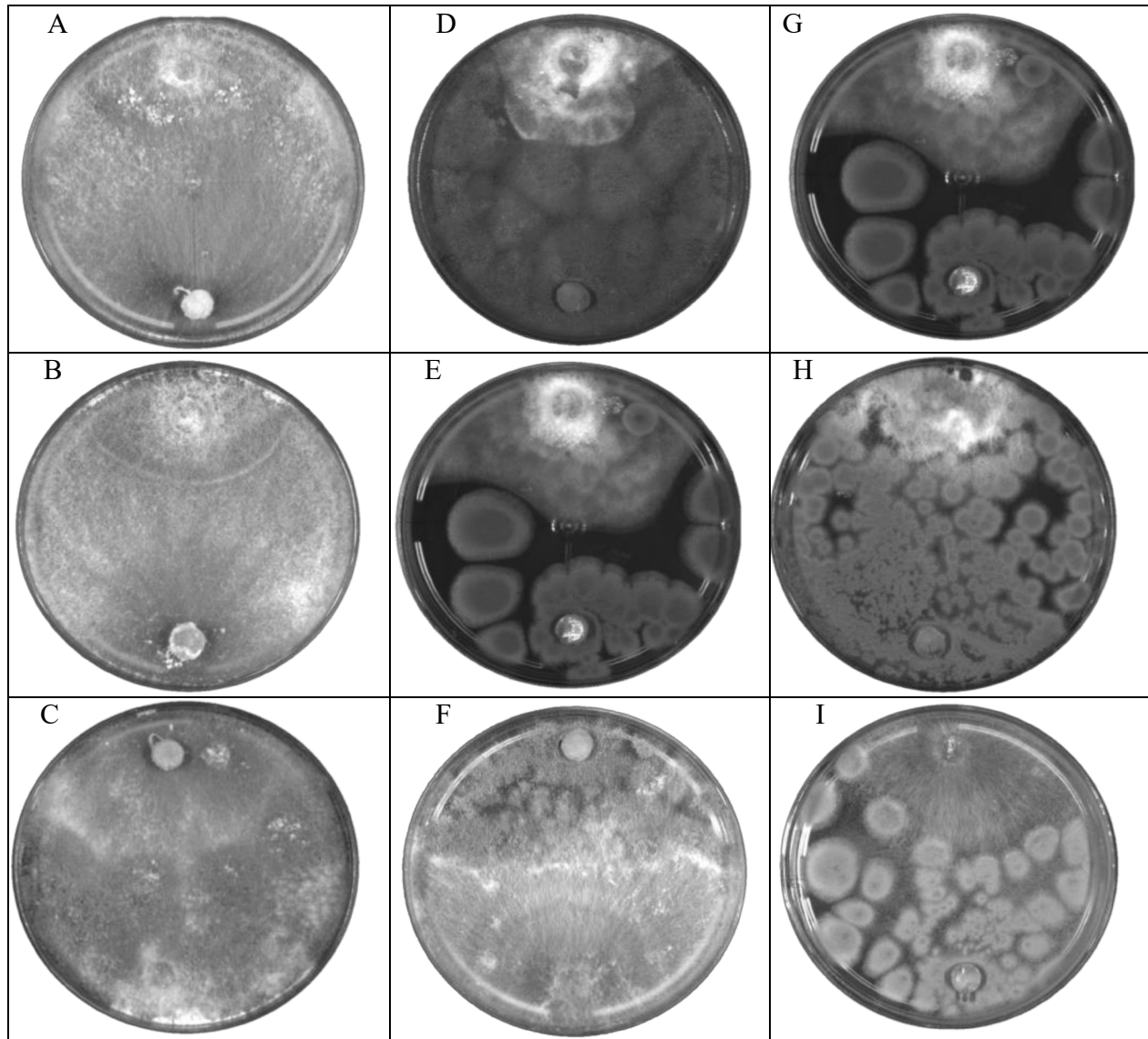
The three antagonistic fungi that exhibited the highest potential for induced systemic resistance (PRGI) have been previously documented as biocontrol agents against various pathogens. For instance, Polanco-Florian *et al.* (2020) identified *Aspergillus* and *Penicillium* as biocontrollers of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fomitopsis meliae*, which are the causative agents of citrus stem-end rot. These fungi were previously considered as saprophytes and toxin producers; however, atoxigenic strains that act via competitive exclusion have been identified, making them suitable for use in commercial formulations of biocontrol products. *Trichoderma*, a widely used biocontrol

mayor inhibición frente a *T. harzianum* (82.55 % y 80.36%, respectivamente). Los porcentajes menores de inhibición se observaron en la confrontación de *Fusarium* sp. contra *Penicillium* sp. (50.77%) y *Rhizoctonia* sp. frente a *Aspergillus flavus*.

Por otra parte, se determinó que de acuerdo con la clasificación de Bell *et al.* (1982) se obtuvieron antagonismo clase 2 y 3 (Cuadro 5). Para la clase 2 se cubrieron dos terceras partes del área de crecimiento de los patógenos; para la clase 3 el agente antagónico y el patógeno colonizaron cada uno la mitad de la superficie, antagonismo clase 3 se observó con *Penicillium* sp. frente a *Phytophthora* spp. y *Rhizoctonia* spp., de la misma forma *T. harzianum* frente a *Rhizoctonia* spp. (Figura 1).

Los hongos encontrados en las plantas que presentaron síntomas de marchitez coinciden con lo documentado por autores como Gómez-Hernández *et al.* (2018), y Albañil-Juárez *et al.* (2015) y Velásquez-Valle *et al.* (2013), quienes asociaron a la enfermedad con *P. capsici*, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp. y *Pythium* sp. En el caso de *Alternaria* sp, se encontró en raíces de plantas que presentaron muerte de brote, este patógeno no siempre ha sido detectado en la marchitez de Chile, autores como Vásquez-López *et al.* (2009) identificaron a *Alternaria* en plantas con síntomas; sin embargo, no determinaron con exactitud su patogenicidad. En tanto, Garibaldi *et al.* (2019) y Begum *et al.* (2010) demostraron que *Alternaria alternata* y *Alternaria tenuis* causaron síntomas e incluso daños severos en la producción. Albañil-Juárez *et al.* (2015) documentaron en el Bajío y suroeste de Guanajuato que los hongos con mayor incidencia han sido *F. oxysporum*, seguido de *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp.

Los tres hongos antagonísticos que mostraron mayores PICR han sido documentados como agentes de biocontrol para otros patógenos, Polanco-Florian *et al.* (2020) identificaron a *Aspergillus* y



**Figure 1.** Dual confrontation (phytopathogen vs. antagonist) *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia* spp. A) *T. harzianum* vs *Phytophthora* spp., B) *T. harzianum* vs *Fusarium* spp., C) *T. harzianum* vs *Rhizoctonia* spp., D) *A. flavus* vs *Phytophthora* spp., F) *A. flavus* vs *Fusarium* spp., G) *A. flavus* vs *Rhizoctonia* spp., H) *Penicillium* sp. vs *Phytophthora* spp., J) *Penicillium* sp. vs *Fusarium* spp., K) *Penicillium* sp. vs *Rhizoctonia* spp. Above: pathogen strain, below: antagonist strain. Cultures of 5 days of growth.

**Figura 1.** Confrontación dual (fitopatógeno vs. antagonístico) *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. A) *T. harzianum* vs *Phytophthora* spp., B) *T. harzianum* vs *Fusarium* spp., C) *T. harzianum* vs *Rhizoctonia* spp., D) *A. flavus* vs *Phytophthora* spp., F) *A. flavus* vs *Fusarium* spp., G) *A. flavus* vs *Rhizoctonia* spp., H) *Penicillium* sp. vs *Phytophthora* spp., J) *Penicillium* sp. vs *Fusarium* spp., K) *Penicillium* sp. vs *Rhizoctonia* spp. Arriba: cepa de patógeno, abajo: cepa de antagonístico. Cultivos de 5 días de crecimiento.

agent, is commercially available as a resistance stimulator, biofertilizer, bioplaguicide, and growth enhancer (Asad, 2022). The biocontrol mechanism of *Trichoderma* against soil-borne pathogens has been extensively studied. Abd-El-Khair *et al.* (2019) reported that *Trichoderma* could stimulate plant defense via the production of enzymes that inhibit the pathogen, thereby reducing root wilt and rot. Jamil (2021) indicated that *Trichoderma* acts as an endophytic symbiont by colonizing plant roots and secreting beneficial chemical stimulants for plants. Michael-Aceves *et al.* (2009) demonstrated that *Trichoderma* species maintain a scale of 1 to 3 values of mycoparasitism against phytopathogens. The selection of *Trichoderma* strains for biocontrol depends on their aggressiveness to mycoparasitism and their growth rate advantage over the pathogen (Guédez *et al.*, 2012). In this work, *T. harzianum* was observed to cover or grow over the phytopathogen *Phytophthora* spp. in less than a week at room temperature, similar to the observations made by Ezziyyani *et al.* (2004), where *T. harzianum* was capable of surpassing *P. capsici* and reducing the pathogen's colony in just four days during *in vitro* confrontation. In the case of root pathogens, Andrade-Hoyos *et al.* (2019) demonstrated the effectiveness of *T. asperellum*, *T. viride*, and *T. harzianum* isolated from soil against *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., and *Phytophthora capsici*, with over 85% inhibition of the strains. The authors attributed this response to the synthesis of secondary metabolites and mycoparasitism mechanisms of action. In another study by Mousumi-Das *et al.* (2018), *T. harzianum* exhibited inhibition against *F. oxysporum* of 78.3%, against *P. capsici* of 65.3%, and against *R. solani* of 45.3%. Lastly, Miguel-Ferrer *et al.* (2021) reported a PGRI of 53% and a class 2 antagonism on the Bell scale of *T. harzianum* against *F. solani*.

*Penicillium* shown to control pathogens through nutrient competition, mycelium disintegration, and

*Penicillium* como biocontroladores de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos, los autores indicaron que durante mucho tiempo estos hongos se han considerado saprofitos, incluso productores de toxinas; sin embargo, basándose en otras investigaciones, se indica que existen razas atoxigénicas que actúan por exclusión competitiva y que por estas características han sido considerados para emplearse en formulaciones comerciales de productos para biocontrol. *Trichoderma* se ha usado por años para el control de patógenos de suelo, de forma comercial se ofrece como un estimulador a la resistencia, biofertilizante, bioplaguicida y mejorador de crecimiento (Asad, 2022). El biocontrol que ejerce *Trichoderma* sobre patógenos asociados a enfermedades de raíz ha sido comúnmente estudiado, de acuerdo con Abd-El-Khair *et al.* (2019) es capaz de estimular la defensa de las plantas a través de la producción de enzimas que inhiben al patógeno y por lo tanto se reduce el marchitamiento y pudriciones de raíces. Jamil (2021) indica que *Trichoderma* actúa como simbionte endófito al colonizar las raíces de las plantas y al mismo tiempo secreta estimulantes químicos benéficos para las plantas. Se ha demostrado que especies de *Trichoderma* mantienen valores de micoparasitismo frente a fitopatógenos en una escala de 1 a 3 (Michael-Aceves *et al.*, 2009), para la elección de cepas de este antagonista se hace referencia a su agresividad para micoparasitar y la ventaja contra el patógeno con respecto a su velocidad de crecimiento (Guédez *et al.*, 2012). En este trabajo se observó que *T. harzianum* fue capaz de cubrir o crecer sobre el fitopatógeno *Phytophthora* spp. en menos de una semana a temperatura ambiente, esto coincide con lo mencionado por Ezziyyani *et al.* (2004) quienes observaron que en la confrontación *in vitro*, *T. harzianum* es capaz de sobre pasar a *P. capsici* y llegar a reducir la colonia del patógeno en solo 4 días. Para patógenos de raíz Andrade-Hoyos

lytic action antibiosis (Jiménez-Camargo *et al.*, 2018). In addition, the production of antimicrobial compounds, such as Glandicolina B, has been identified (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). As for *Aspergillus*, it is generally capable of inhibiting pathogen growth via antibiosis and nutrient competition (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008). This fungus has also found to produce antifungal compounds, such as Fumitremorgin B (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Atalla *et al.* (2020) demonstrated that *Aspergillus oryzae* reduced the linear growth of root rot-causing pathogens, including *A. alternata*, *F. oxysporum*, *Phoma destructor*, *R. solani*, and *Sclerotium rolfsii*, through the production of xylanase in fava bean. However, Quiroz-Sarmiento *et al.* (2008) noted that although some strains of *Aspergillus* exhibit antagonism against root pathogens, pathogenicity tests are necessary to evaluate the possible production of enzymes and toxicological risks to the plant. There are studies demonstrating effective biological control of root-associated pathogens using *Penicillium*. Boughalleb-M'Hamdi *et al.* (2018) found that applying *P. italicum* and *P. digitatum* reduced root damage and disease severity in melon seedlings. The degree of antagonism of *Aspergillus* and *Penicillium* has not been extensively documented, and there are few studies regarding the type of antagonism they exhibit. Rather than defining the type of antagonism, the percentage of inhibition of pathogen growth is referred to Silva-Acosta and Paez-Redondo (2021) evaluated the effect of strains of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Trichoderma* on the control of *Phytophthora* sp. associated with oil palm. Their results showed that *A. niger* and *Trichoderma* sp. exhibited 74% and 79% inhibition in the growth of the oomycete, respectively. Moreover, Almeyda-León *et al.* (2020) identified *Aspergillus* and *Penicillium* as biocontrollers in the growth of *Macrophomina*

*et al.* (2019) demostraron la efectividad de *T. aspergillum*, *T. viride* y *T. harzianum* aislados de suelo sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora capsici*, sus resultados mostraron que no existieron diferencias significativas en la inhibición de las cepas, que fue superior a 85%; los autores señalaron que esta respuesta se debía a la síntesis de metabolitos secundarios y mecanismos de acción de micoparasitismo. En otro estudio realizado por Mousumi-Das *et al.* (2018) determinaron que *T. harzianum* mostró inhibición frente a *F. oxysporum* de 78.3%, para *P. capsici* de 65.3% y con *R. solani* 45.3%. Por otra parte, Miguel-Ferrer *et al.* (2021), determinaron un PICR de 53% y una clase 2 de antagonismo en la escala de Bell de *T. harzianum* frente a *F. solani*.

En el caso de *Penicillium*, el biocontrol se ha determinado por competencia de nutrientes, desintegración del micelio del patógeno y por antibiosis de acción lítica (Jiménez-Camargo *et al.*, 2018), además también se ha identificado la producción de compuestos antimicrobianos como la Glandicolina B (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). De forma general, *Aspergillus* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos a través de la antibiosis y la competencia por nutrientes (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008), también se ha identificado en este hongo la producción de compuestos antifúngico como la Fumitremorgina B (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Por otra parte, Atalla *et al.* (2020) demostraron que *Aspergillus oryzae* a través de la producción de xilanasa disminuyó el crecimiento lineal de *A. alternata*, *F. oxysporum*, *Phoma destructor*, *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* causantes de la pudrición de raíz en haba. No obstante, Quiroz-Sarmiento *et al.* (2008) reconocen que, aunque se han encontrado cepas de *Aspergillus* que presentan antagonismos frente a patógenos de raíz, es necesario realizar pruebas de patogenicidad y evaluar la posible

*phaseolina* in percentages above 60%. Similarly, Jiménez-Camargo *et al.* (2018) demonstrated that strains of *Penicillium* caused inhibitions ranging from 54% to 81% in the development of *P. capsici* isolated from seedlings with wilt symptoms.

*Rhizoctonia* spp., *Phythium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. and *Phytophthora* spp. were isolated from chili bell pepper plants grown in production fields located in southern Guanajuato, Mexico. Three strains, namely *T. harzianum*, *A. flavus*, and *Penicillium* sp., exhibit constant antagonism against these pathogens, resulting in inhibition levels ranging from 41% to 83%. Other studies are required to determine if *A. flavus* and *Penicillium* sp. can be used as effective biocontrol agents. These findings suggest that these three organisms are an alternative to control phytopathogens associated with soil wilt in production areas. In light of the *in vitro* inhibitory effect observed, it is crucial to continue and scale up the potential control of the disease *in situ* to ensure its efficacy and practical application.

## CITED LITERATURE

- Abd-El-Khair H, Elshahawy IE, Haggag HEK. 2019. Field application of *Trichoderma* spp. combined with thiophanate-methyl for controlling *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in dry bean. Bulletin of the National Research Centre 43:19. <https://doi.org/10.1186/s4226>.
- Albañil-Juárez JA, Mariscal-Amaro LA, Martínez-Martínez TO, Anaya-López JL, Cisneros López HC y Pérez Ramírez HA. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6(spe11):2191-2197. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i11.797>.
- Almeyda-León IH, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI, Rodríguez-Villarreal RA, Robledo-Leal ER, Armijo-Martínez LF. 2020. Caracterización funcional de hongos aislados de suelo por su capacidad antagónica contra *Macrophomina phaseolina*. Biotecnología y Sustentabilidad 5(1):62-74. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v5i1.920>.
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Osorio-Hernández E, Molina-Gayosso E, Landero-Valenzuela N y Barrales-Cureño H. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp.

producción de enzimas y los riegos toxicológicos a la planta. En relación al uso de *Penicillium*, existen estudios que demuestran un control biológico eficaz de patógenos asociados a raíz, Boughalleg-M'Hamdi *et al.* (2018) determinaron que al aplicar *P. italicum* y *P. digitatum* se redujo el daño a raíces en plántulas de melón, además disminuyó la severidad de la enfermedad. El grado de antagonismo de *Aspergillus* y *Penicillium* no ha sido documentado de forma extensa, son escasos los estudios con respecto a la clase de antagonismo que ejercen, no se define el tipo de antagonismo sino refieren el porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos. Silva-Acosta y Paez-Redondo (2021) evaluaron el efecto de cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* sobre el control de *Phytophthora* sp. asociado a palma aceitera, sus resultados demostraron que *A. niger* y *Trichoderma* sp. mostraron 74 y 79% de inhibición en el crecimiento del oomicete, respectivamente. Por otra parte, Almeyda-León *et al.* (2020) identificaron a *Aspergillus* y *Penicillium* como biocontroladores en el crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en porcentajes superiores al 60%. De la misma forma, Jiménez-Camargo *et al.* (2018) demostraron que cepas de *Penicillium* causaban inhibiciones del 54 al 81% en el desarrollo de *P. capsici* aislada de plántulas con síntomas de marchitez.

Se aislaron *Rhizoctonia* spp., *Phythium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. y *Phytophthora* spp. asociados a plantas de chile en predios de producción, ubicados en el sur de Guanajuato, México. Con el muestreo realizado en las unidades productoras de chile con problemas de marchitez, se identificaron tres cepas (*T. harzianum*, *A. flavus* y *Penicillium* sp.) que presentaron antagonismo constante, con inhibición de 41 al 83%. En el caso de *A. flavus* y *Penicillium* sp., es importante continuar con estudios detallados para determinar si es posible utilizarlos como biocontroladores. Los



- vs hongos asociados a la marchitez de chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(6):1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>.
- Asad SA. 2022. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases-A review. Ecological complexity 49: 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978>.
- Atalla SMM, Ahmed NE, Awad HM, El Gamal NG, El Shamy AR. 2020. Statistical optimization of xylanase production, using different agricultural wastes by *Aspergillus oryzae* MN894021, as a biological control of faba bean root diseases. Egyptian Journal of Biological Pest Control 30:125. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00323-z>.
- Barnett H. and Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul Minnesota. USA. 218 p.
- Begum MF, Rahman MA and Alam MF. Biological Control of *Alternaria* fruit rot of chili by *Trichoderma* species under field conditions. 2010. Mycobiology 38(2):113-117. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.2.113>.
- Bell D, Well H and Markham C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>.
- Boughalleb-M'Ha mdi N, Sa le m I.B a n d M'Ha mdi M. 2018. Evaluation of the efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* species as biological control agents against four soil-borne fungi of melon and watermelon. Egyptian Journal of Biological Pest Control 28:25.
- Correa S, Mello M, Ávila Z, Minare L, Pádua R y Gomes D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SAAC. Fitosanidad 11(1): 3-9.
- Ezziyanyani M, Pérez SC, Sid AA, Requena ME y Candela ME. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología 26:35-45.
- Garibaldi A., Gilardi G., Matic S., Gullino M. L. 2019. First report of *Alternaria alternata* on chili pepper (*Capsicum frutescens*) in Italy. Plant Disease 103(5):1024-1025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1616-PDN>
- Gómez-Hernández D, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C. 2018. Pathogenicity of *Phytophthora capsici* Leon and *Rhizoctonia solani* Khün, on seedlings of 'costeño' pepper (*Capsicum annuum* L.). Revista BioCiencias 5,e356. <https://doi.org/10.15741/revbio.05.e356>.
- González-Chavira M M, Villordo-Pineda E, Pons-Hernández JL, Delgadillo-Sánchez F, Paredes-Melesio R, Godoy-Hernández H, Anaya-López JL, Gámez-Vázquez FP, Medina-Cazares T y Rodríguez-Guerra R. 2009. Guía para el manejo de la marchitez del chile en Guanajuato. México: Prometeo Editores. Primera Edición. ISBN. 978-607-953013-6.
- Guédez C, Cañizalez L, Castillo C y Olivares R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y resultados sugieren a estos tres organismos como alternativa de control biológico para fitopatógenos asociados a la marchitez del suelo empleando los antagonistas que están en estrecha relación dentro de las áreas de producción. De acuerdo con el efecto inhibitorio *in vitro* observado, se precisa continuar y escalar el posible control de la enfermedad *in situ* que aseguren su efectividad y uso.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 32(1):44-49. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562012000100009](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100009).
- Jamil A. 2021. Antifungal and plant growth promoting activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* colonizing tomato. Journal of Plant Protection Research 61(3): 243-253. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137950>
- Jiménez-Camargo A, Valadez-Moctezuma E y Lozoya-Saldaña H. 2018. Antagonismo de *Penicillium* sp. contra *Phytophthora capsici* (Leonian). Revista Fitotecnia Mexicana 41(2), 137-148. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.137-148>
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter ACRC, Lévesque CA, Cammue BPA and Thomma BPHJ. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. FEMS Microbiology Letters 223(1): 113-122. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00352-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00352-5).
- Michael-Aceves AC, Otero-Sánchez M and Solano-Pascacio L. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "escoba de bruja" del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 27:18-26. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S0185-33092009000100003&](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S0185-33092009000100003&)
- Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA y Fernández-Pavía SP. 2021. Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco. Revista Mexicana de Fitopatología 39(2):228-247. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>
- Montero-Tavera V, Guerrero-Aguilar BZ, Anaya-López JL, Martínez-Martínez TO, Guevara- Olvera L y González-Chavira MM. 2013. Diversidad genética de aislados de

- Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. Revista Mexicana de Fitopatología 4(7):1043-1054. <https://doi.org/10.29312/remexca.v4i7.1144>.
- Morid B, Hajmansoor S, Kakvan N. 2012. Screening of resistance genes to *Fusarium* root rot and *Fusarium* wilt diseases in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars using RAPD and CAPs markers. Euro Journal of Experimental Biology 2:931-939. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/79909>
- Mousumi MD, Haridas M and Sabu A. 2018. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.021>.
- Pérez-Acevedo CE, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C, Enríquez del Valle R, Villegas-Aparicio Y. 2017. Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del Chile en Valles Centrales de Oaxaca. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(2): 281-293. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.50>.
- Polanco-Florián LG, Alvarado-Gómez OG, Olivares-Sáenz E, González-Garza R y Pérez-González O. 2020. Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. Revista mexicana de ciencias agrícolas 11(5):1069-1081. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2272>
- Quiroz-Sarmiento VF, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, y Lara Hernández ME. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista Mexicana de Micología 26: 27-34. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802008000100005](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000100005)
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Acciones y Programas. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. En línea: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (Consulta, junio 2022)
- Sánchez-Fernández RE, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez A, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez MC y Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. TIP 16(2): 132-146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9).
- Silva-Acosta GE y Paez-Redondo AR. 2021. Antagonismo *in vitro* de nueve hongos aislados del Caribe colombiano sobre *Phytophthora* sp. asociado a palma aceitera. Ingeniería y Desarrollo 39(2):2145-9371. <https://dx.doi.org/10.14482/inde.39.2.579.546>
- Sneh BL and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. Am Phytopathol Soc Press. St. Paul, Minnesota. 133 pp.
- Suárez C, Fernández R, Valero N, Gámez R y Páez A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología 10(3): 35-43. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_artext&pid=S0123-34752008000200005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_artext&pid=S0123-34752008000200005).
- Tembhurne B, Belabadevi B, Kisan B, Tilak I, Ashwathanarayana D, Suvarna N and Naik M. 2017. Molecular Characterization and Screening for *Fusarium (Fusarium solani)* Resistance in Chili (*Capsicum annuum* L.) Genotypes. International Journal Current Microbiology Applied Science. 6:1585-1597. 23. DOI:10.20546/ijcmas.2017.609.195.
- Van del Plaats-Niterink A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in micology 21:1-242. <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim21/full%20text.htm>.
- Vásquez L A, Tlapal BB, Yáñez MM, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del “Chile de agua” (*Capsicum annuum*) en Oaxaca, México. Revista Fitotecnica de México 32 (2): 127-134. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v32n2/v32n2a8.pdf>.
- Velásquez-Valle R y Amador-Ramírez, MD. 2007. Análisis sobre la investigación del Chile seco (*Capsicum annuum* L.), realizadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en los estados de Aguascalientes y Zacatecas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 25:80-84. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092007000100011](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100011).
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols a guide to methods and applications 315 -322. Academic Press, San Diego. 1990.
- Yadav M., Kumar D.M. and Sanmukh U.R. 2021. Systemic Resistance in Chilli Pepper against Anthracnose (Caused by *Colletotrichum truncatum*) Induced by *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Paenibacillus dendritiformis*. Journal of Fungi (Basel) 7(4): 307. <https://doi.org/10.3390/jof7040307>.
- Zhao X, Liu X, Zhao H, Ni Y, Lian Q, Qian H, He B, Liu H and Ma Q. 2021. Biological control of *Fusarium* wilt of sesame by *Penicillium bilaiae* 47M-1. Biological Control 158, 104601. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104601>

# Evaluation of resistance to *Fusarium* wilt race 1 in new banana clones

## Evaluación de la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1 en nuevos clones de banano

**Rómulo García-Velasco**, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero km 1.5, Tenancingo, Estado de México, CP 52400, México; **José de La Caridad Ventura-Martín**, Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales, Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, CP 53 000, Cuba; **José C. Lorenzo-Feijoo**, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez, Carretera a Morón km 9, Ciego de Ávila, CP 69450, Cuba; **Nayanci Portal-González**, **Ramón Santos-Bermúdez**, Universidad Técnica “Luis Vargas Torres” de Esmeraldas, Campus Mútiles, San Mateo, Esmeraldas, CP 080150, Ecuador; **Armando Rodríguez-García**, **Barbarita Companioni-González\***, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, CP 25315, México.

\*Corresponding autor: bcompanioni2007@gmail.com

Received: April 03, 2023.

Accepted: April 26, 2023.

García-Velasco R, Ventura-Martín JdLC, Lorenzo-Feijoo JC, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Rodríguez-García A and Companioni-González B. 2023. Evaluation of resistance to *Fusarium* wilt race 1 in new banana clones. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 285-297.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2304-1>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

**Abstract.** In previous works, a method was developed for the differentiation at the foliar level of the response of banana plants to *Fusarium* race 1 wilt, which constitutes a useful tool to increase the efficiency of resistance selection in *ex vitro*

**Resumen.** En trabajos previos se desarrolló un método para la diferenciación a nivel foliar de la respuesta de plantas de banano a la marchitez por *Fusarium* raza 1, el cual constituye una herramienta útil para incrementar la eficiencia de la selección de la resistencia en condiciones *ex vitro*. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la resistencia a esta enfermedad en nuevos clones de banano mediante el método de evaluación mencionado. Para ello se realizaron seis momentos de evaluación; y se utilizaron diez plantas de cada línea seleccionada del clon ‘Zanzíbar’ irradiado. Los resultados evidenciaron que las plantas de las líneas evaluadas del clon ‘Zanzíbar’ irradiado indican ser materiales promisorios para el mejoramiento genético en el cultivo dirigido a la resistencia a esta enfermedad. Por otra parte, se obtuvo una respuesta a la

conditions. The objective of this work was to evaluate resistance to this disease in new banana clones using the evaluation method mentioned. For this, six moments of evaluation were made; and ten plants of each selected line of the irradiated 'Zanzíbar' clone were used. The results showed that the plants of the evaluated lines of the irradiated 'Zanzíbar' clone indicate that they are promising materials for genetic improvement in the crop aimed at resistance to this disease. On the other hand, a response to selection was obtained in a short time (48 hours), as well as evaluating the lines selected from large populations of plants (60 plants) with the exclusion of other organisms; and the control of environmental conditions that could interfere with the results obtained. However, it is necessary to continue additional studies in the field to confirm the resistance in the evaluated lines.

**Key words:** biotechnology, disease, *Musa* spp., early selection.

Bananas and plantains (*Musa* spp.) are a significant source of food for a large portion of the global population. However, their production is threatened by diseases such as *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), which is one of the most destructive and economically important diseases in the genus *Musa*. The control of this vascular pathogen using agrochemicals is expensive and harmful to the environment (FAOSTAT, 2020). Therefore, genetic improvement for resistance is considered the only effective and safe control method in recent years (Saraswathi *et al.*, 2016). The use of biotechnological techniques to support genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in bananas has facilitated the introduction of improvement results much faster than conventional

selección en un reducido tiempo (48 horas), así como evaluar las líneas seleccionadas a partir de grandes poblaciones de plantas (60 plantas) con la exclusión de otros organismos; y el control de las condiciones ambientales que pudieran interferir en los resultados obtenidos. Sin embargo, constituye una necesidad continuar estudios adicionales en campo para confirmar la resistencia en las líneas evaluadas.

**Palabras clave:** biotecnología, enfermedad, *Musa* spp., selección temprana.

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) constituyen una importante fuente de alimento para una gran parte de la población mundial. Sin embargo, la producción de las musáceas se encuentra amenazada por la incidencia de enfermedades como la marchitez por *Fusarium*. Esta enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) representa una de las enfermedades más destructivas y de importancia económica en el género *Musa*. El control del patógeno vascular con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente (FAOSTAT, 2020). Por ello, en los últimos años se ha considerado al mejoramiento genético para la resistencia como la única forma de control efectivo y segura (Saraswathi *et al.*, 2016). En este sentido, la utilización de técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético para la resistencia a la marchitez por *Fusarium* en banano ha permitido introducir los resultados de la mejora con mayor rapidez; en comparación con los métodos del mejoramiento genético convencional (García *et al.*, 2021). Por otro lado, han permitido aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético en el cultivo (Saraswathi *et al.*, 2016). Ventura *et al.* (2015) mediante el uso combinado del cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro*

genetic improvement methods (García *et al.*, 2021). Moreover, it has increased the efficiency of genetic improvement programs in cultivation (Saraswathi *et al.*, 2016). Ventura *et al.* (2015) obtained a wide genetic variability in the ‘Zanzíbar’ cultivar (group AAB) using a combination of tissue culture and *in vitro* mutagenesis in meristematic apices, selecting 15 mutants. ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’ were the most promising materials for genetic improvement in the cultivation, due to their high yield, elimination of superficial corms, decreased height, and ordered suckering. This study aimed to evaluate the resistance to *Fusarium* wilt race 1 in new banana clones ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’ obtained through biotechnological techniques in Cuba.

The research was carried out at the Laboratory of Plant-Pathogen Interaction of the Bioplants Center of the University of Ciego de Avila “Máximo Gómez Báez”, Cuba.

**Evaluated lines of clone ‘Zanzíbar’ (group AAB).** The study utilized selected lines from the ‘Zanzíbar’ clone (group AAB) - ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’. These lines were obtained from the *Musa* spp. genetic improvement program at the National Institute of Tropical Root and Tuber Crops Research in Santo Domingo, Villa Clara, Cuba (INIVIT). The program utilized ionizing radiation (gamma rays) on meristematic apices of the ‘Zanzíbar’ clone *in vitro* culture, resulting in the selection of 15 mutants. After three vegetative cycles under field conditions, ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’ lines were chosen as the most advanced materials for genetic improvement in cultivation. These lines are being proposed for registration as new genotypes in *Musa* spp. by the International Atomic Energy Agency (IAEA) (Ventura *et al.*, 2015).

en ápices meristemáticos del cultivar ‘Zanzíbar’ (grupo AAB) obtuvieron una amplia variabilidad genética en el clon ‘Zanzíbar’ donde seleccionaron 15 mutantes. Las líneas ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ resultaron los mejores materiales promisorios para el mejoramiento genético en el cultivo por su alto rendimiento; por la eliminación de los cormos superficiales; por la disminución en la altura; y por el ahijamiento ordenado. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1 en nuevos clones de banano ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ obtenidos mediante técnicas biotecnológicas en Cuba.

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Interacción Planta – Patógeno del Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”, Cuba.

**Líneas evaluadas del clon ‘Zanzíbar’ (grupo AAB).** Se utilizaron las líneas seleccionadas del clon ‘Zanzíbar’ (grupo AAB) (‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’). Las cuales fueron obtenidas en el programa de mejoramiento genético de *Musa* spp. que se desarrolló en el Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales de Santo Domingo, Villa Clara, Cuba (INIVIT). En el cual mediante la utilización de radiaciones ionizantes (rayos gamma) en ápices meristemáticos del clon ‘Zanzíbar’, a partir del cultivo *in vitro* lograron la selección de 15 mutantes. Posteriormente, en condiciones de campo, y durante tres ciclos vegetativos seleccionaron las líneas ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ como los materiales más avanzados para el mejoramiento genético en el cultivo. Los cuales son propuestos para ser registrados por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) como nuevos genotipos en *Musa* spp. (Ventura *et al.* 2015).

**Material vegetal.** Se utilizaron muestras foliares de las líneas ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ de ocho a

**Plant material.** Leaf samples from the 'Z 13', 'Z 30' and 'Z 30 A' lines, eight to nine months old, planted in the INIVIT Banana Germplasm Bank, were used.

**Fungal strain.** We used a FOC race 1 isolate (belonging to the vegetative compatibility group (VCG) [01210] from the culture collection of the Institute of Plant Health Research (INISAV), Havana, Cuba.

**Filtration of the fungus culture (FC).** To obtain a liquid culture of the fungus, mycelial discs measuring 8 mm in diameter were taken from the periphery of colonies grown on Petri dishes containing Potato Dextrose Agar culture medium. Next, 100 mL of Czapek broth culture medium with a pH of 5.5 was added to a 250 mL Erlenmeyer flask. A mycelial disc was then inoculated into the flask and incubated for 24 days at  $28\pm 2$  °C,  $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity, and a 12-hour light/12-hour dark photoperiod. The fungal culture (FC) was harvested after 24 days and filtered through four layers of gauze and Whatman No. 1 filter paper. Following filtration, it was centrifuged at 8000 rpm for 20 minutes in a Sigma-201M centrifuge to remove mycelial and conidial debris. The supernatant was then passed through filters with 0.22  $\mu\text{m}$  diameter pores (Sartorius, NG, Göttingen, Germany). The FC was then concentrated to 80% (v/v) through rotary evaporation, using a Heidolph rotary evaporator, Bioblock, Paris, France. Two treatments were utilized in the experiment: 1) concentrated FC of the fungus (Czapek broth culture medium inoculated with the fungus and incubated for 24 days); and 2) Czapek broth culture medium without the fungus and incubated for 24 days, which was used as a control treatment.

**Procedure for evaluating resistance to *Fusarium* wilt race 1.** To evaluate resistance and susceptibility,

nueve meses de plantadas en el Banco de Germoplasma de Banano del INIVIT.

**Cepa fúngica.** Se utilizó un aislado de FOC raza 1 (perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) [01210] procedente del cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba.

**Filtrado del cultivo del hongo (FC).** Para obtener el cultivo en medio líquido del hongo, se tomaron discos de micelio de 8 mm de diámetro próximos a la periferia de la colonia crecida en placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Se añadió 100 mL de medio de cultivo Caldo Czapek con un pH 5.5, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. En el matraz se sembró un disco de micelio y se incubó durante 24 días a  $28\pm 2$  °C,  $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa; y con un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. El FC del hongo se cosechó a los 24 días, donde se filtró mediante cuatro capas de gasa y luego por papel de filtro Whatman No. 1. Se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Sigma-201M para eliminar los restos de micelio y conidios. El sobrenadante se pasó a través de filtros con poros de 0.22 mm de diámetro (Sartorius, NG, Göttingen, Alemania). El FC se concentró por rotoevaporación (en rotoevaporador Heidolph, Bioblock, París, Francia) al 80% (v/v). Para llevar a cabo el experimento se utilizaron dos tratamientos que consistieron: 1) el FC del hongo concentrado (medio de cultivo Caldo Czapek inoculado con el hongo e incubado durante 24 días); y 2) el medio de cultivo Caldo Czapek, sin el hongo e incubado durante 24 días, y que se utilizó como tratamiento testigo.

**Procedimiento para evaluar la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1.** Para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad se establecieron seis momentos de evaluación (cada dos meses en el

six evaluation intervals were established (every two months within the same year of the experiment). Healthy middle-aged leaves were collected from each line ('Z 13', 'Z 30', and 'Z 30 A') in the field. Eighteen punctures were made on each leaf using a sterile needle on the adaxial side of the leaf blade, spaced 3 cm apart and in three different positions (distal, middle, and proximal). After the damage was inflicted, 5  $\mu\text{L}$  of fungus culture filtrate (FC) and 5  $\mu\text{L}$  of concentrated medium without fungus (control treatment) were added. The leaves were incubated for 48 hours at  $28 \pm 2$  °C,  $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity, 12-hour light/12-hour dark photoperiod, and 70% relative humidity. The elliptical lesion area ( $\text{mm}^2$ ) of the leaves was measured after 48 hours according to Companioni *et al.* (2005). Leaf fragments with elliptical lesions of 5 x 5 cm were then extracted and placed in liquid nitrogen for subsequent biochemical analyses. Biochemical indicators, including peroxidase activity, chlorophyll pigment levels (a, b, and total), free and cell wall-bound phenol content, malondialdehyde, other aldehydes, and proteins were evaluated.

Peroxidase activity was assessed using the Pascual *et al.* (1983) method. Leaf fragments (100.0 mg) were pulverized in liquid nitrogen and then extracted with a tris-HCl buffer solution (0.01 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7.0). The reaction mixture consisted of 0.1 mL of leaf extract, 1.0 mL of tris-HCl buffer solution (0.01 mol  $\text{L}^{-1}$ ), 0.15 mL of guajacol (100 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), and 20  $\mu\text{L}$  of hydrogen peroxide. The absorbance at 470 nm was monitored every 15 seconds for three minutes, and the average change in absorbance of the linear segment of the curve was used to estimate peroxidase activity. The reaction of the guajacol and hydrogen peroxide substrates was accounted for in each determination. Guajacol peroxidase enzymatic activity was reported as U  $\text{g}^{-1}$  fresh leaf weight, where 1 U represents the

mismo año del desarrollo de la experimentación). Se realizó la colecta en campo de hojas sanas de mediana edad según la posición en la planta (hojas 3, 4 y 5) de cada línea a evaluar ('Z 13', 'Z 30' y el 'Z 30 A'). En cada hoja se realizaron 18 punteaduras con una aguja estéril en el lado adaxial del limbo de la hoja con 3 cm de separación entre ellas; y en tres posiciones diferentes (distal, medio y proximal). Después del daño, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  del filtrado de cultivo del hongo (FC) y 5  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo sin el hongo y concentrado (tratamiento testigo). Las hojas se incubaron durante 48 horas a  $28 \pm 2$  °C,  $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y 70% de humedad relativa. Transcurridas las 48 horas se midió el área de las lesiones elíptica ( $\text{mm}^2$ ) de las hojas de acuerdo a Companioni *et al.* (2005); y se extrajeron fragmentos de hoja con las lesiones elípticas de (5 x 5 cm) que se colocaron en nitrógeno líquido para los posteriores análisis bioquímicos. Se evaluaron los siguientes indicadores bioquímicos: actividad peroxidasa, niveles de pigmentos clorofílicos (a, b y totales), contenido de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, malondialdehído, otros aldehídos y proteínas.

La actividad peroxidasa se determinó según el método de Pascual *et al.* (1983). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7.0). La mezcla de la reacción incluyó: 0.1 mL de extracto de hojas, 1.0 mL de solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol  $\text{L}^{-1}$ ), 0.15 mL de guayacol (100 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) y 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno. Se evaluó la absorbancia 470 nm cada 15 segundos durante tres minutos. El promedio de la variación de la absorbancia de la sección lineal de la curva se tomó para estimar la actividad peroxidasa. En cada determinación se consideró la reacción espontánea en el tiempo de los sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. La

conversion of 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per minute. Additionally, peroxidase activity was expressed as  $\text{U mg}^{-1}$  of protein.

The chlorophyll pigment content was determined following Porras (1991). Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen and then mixed with 0.5 mL of 80% acetone. After centrifugation at 12,100  $\text{xg}$  for 15 minutes at 4 °C, the supernatant was collected and the absorbance was measured at 647 nm and 664 nm. Chlorophyll content was calculated as:  $13.19 \times \text{Absorbance}_{664\text{nm}} - 2.57 \times \text{Absorbance}_{647\text{nm}}$ . Chlorophyll b content was calculated as  $22.10 \times \text{Absorbance}_{647\text{nm}} - 5.26 \times \text{Absorbance}_{664\text{nm}}$ . Total chlorophyll pigment content was determined by adding  $7.93 \times \text{Absorbance}_{664\text{nm}} + 19.53 \times \text{Absorbance}_{647\text{nm}}$ .

The method of Gurr *et al.* (1992) was used to determine the content of free and cell wall-bound phenols. Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen followed by the addition of 0.5 mL of methanol. After vortexing and centrifugation at 12,100  $\text{xg}$  for 15 minutes, the precipitate was subjected to two additional cycles of extraction with methanol. The resulting supernatant was collected and designated as the fraction of free phenols. The precipitate was treated with sodium hydroxide ( $2.0 \text{ mol L}^{-1}$ ) for 16 hours at 70 °C, followed by addition of hydrochloric acid (0.25 mL,  $2.0 \text{ mol L}^{-1}$ ) and centrifugation at 12,100  $\text{xg}$  for 15 minutes. The resulting supernatant was considered the reservoir of cell wall-bound phenols. To quantify free and cell wall-bound phenols, 20  $\mu\text{L}$  of the supernatant was mixed with 980.0  $\mu\text{L}$  of distilled water, and Folin-Ciocalteu's phenol reagent (100.0  $\mu\text{L}$ ) was added, followed by incubation for 5 minutes. Sodium bicarbonate (600.0  $\mu\text{L}$ , saturated with sodium hydroxide ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ )) was then added, and after 60 minutes, the absorbance at 725 nm was measured. The content of phenols was expressed in mg of phenols  $\text{g}^{-1}$

actividad enzimática guayacol peroxidasa fue expresada como unidades  $\text{U g}^{-1}$  masa fresca de la hoja donde 1 U corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato transformado en 1 minuto.

El contenido de pigmentos clorofílicos se determinó según Porras (1991). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido y posteriormente se adicionaron 0.5 mL de acetona al 80%. Las muestras se centrifugaron a 12 100  $\text{xg}$ , 4 °C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se evaluó la absorbancia 647 nm y 664 nm. El contenido de clorofila se calculó de la siguiente forma:  $13.19 \times \text{Absorbancia}_{664\text{nm}} - 2.57 \times \text{Absorbancia}_{647\text{nm}}$ . El contenido de clorofila b se midió a través de la diferencia de  $22.10 \times \text{Absorbancia}_{647\text{nm}} - 5.26 \times \text{Absorbancia}_{664\text{nm}}$ . El contenido total de pigmentos clorofílicos se obtuvo a partir de la suma de  $7.93 \times \text{Absorbancia}_{664\text{nm}} + 19.53 \times \text{Absorbancia}_{647\text{nm}}$ .

El contenido de fenoles libres y ligados a las paredes celulares se determinó de acuerdo a Gurr *et al.* (1992). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido y luego se adicionó 0.5 mL de metanol. Las muestras fueron agitadas en un vortex y se centrifugaron a 12 100  $\text{xg}$ , durante 15 minutos. El precipitado se sometió a dos ciclos adicionales de extracción con metanol, como se describió anteriormente. El sobrenadante se colectó siempre y se consideró como la fracción de los fenoles libres. El precipitado se incubó con 0.25 mL de hidróxido de sodio ( $2.0 \text{ mol L}^{-1}$ ) durante 16 horas a 70 °C. Se adicionó ácido clorhídrico (0.25 mL,  $2.0 \text{ mol L}^{-1}$ ) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a 12 100  $\text{xg}$ , durante 15 minutos. El precipitado se descartó y el sobrenadante se consideró como el reservorio de los fenoles ligados a las paredes celulares. Con el objetivo de cuantificar los niveles de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se mezclaron con 980.0  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se adicionó 100.0  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu,



fresh leaf weight and was referenced to a standard curve of chlorogenic acid.

The levels of malondialdehyde and other aldehydes were evaluated following the protocol of Heath and Packer (1968). Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen and mixed with 1.4 mL of distilled water, briefly vortexed. Then, 1.5 mL of thiobarbituric acid (0.5%, w/v; in trichloroacetic acid 20%, v/v) was added, and the samples were incubated at 100 °C for 25 minutes in a water bath. After cooling the samples on ice for 15 minutes, they were centrifuged at 756 xg for 10 minutes. The supernatant's absorbance was measured at 455 nm, 532 nm, and 600 nm. The non-specific absorbance of the reaction product was measured at 600 nm and subtracted from the maximum absorbance at 532 nm for malondialdehyde measurements and at 455 nm for other aldehydes. The concentrations of malondialdehyde were calculated using an extinction coefficient of 155 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 532 nm. For other aldehydes, the extinction coefficient was 45.7 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (average of the extinction coefficients of propanal, butanal, hexanal, and propanal-dimethylacetal) at 532 nm.

The protein concentration was determined according to Bradford (1976). Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen, and extracted with a tris-HCl buffer solution (0.01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.0). A 0.1 mL leaf extract was mixed with 1.0 mL of Bradford reagent, and the absorbance was measured at 595 nm. The protein content was expressed in mg of protein per g of fresh leaf mass, using a standard curve of bovine serum albumin (BSA). The protein content present in the fungal culture filtrate was subtracted from the total protein content determined in the leaves, 48 hours after the application of the fungal culture filtrate.

Each treatment included three leaves from different plants in each evaluated line ('Z 13', 'Z 30'

y las muestras se incubaron durante 5 minutos. Se adicionó bicarbonato de sodio (600.0 µL, saturado con hidróxido de sodio (0.1 mol L<sup>-1</sup>)) y transcurrido 60 minutos se determinó la absorbancia a 725 nm. El contenido de fenoles se expresó en mg de fenoles g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja referidos a una curva patrón de ácido clorogénico.

El contenido de malondialdehído y otros aldehídos se evaluó según Heath y Packer (1968). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido. Las muestras maceradas se mezclaron con 1.4 mL de agua destilada, y se agitaron brevemente en un vortex. Se adicionaron 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.5%, m/v; en ácido tricloroacético 20%, v/v), y las muestras se incubaron en baño de María a 100 °C, durante 25 minutos. Más tarde, las muestras se enfriaron en hielo por un tiempo de 15 minutos, y se centrifugaron a 756 xg, durante 10 minutos. Se evaluó la absorbancia del sobrenadante a 455 nm, 532 nm y 600 nm. La absorbancia no específica del producto de la reacción se midió a 600 nm, y se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del malondialdehído, y a 455 nm para otros aldehídos. Para los cálculos de las concentraciones del malondialdehído se utilizó un coeficiente de extinción de 155 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 532 nm. Para los otros aldehídos, el coeficiente de extinción fue de 45.7 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (promedio de los coeficientes de extinción del propanal, butanal, hexanal, y propanal-dimetilacetal) a 532 nm.

La concentración de proteínas se determinó según Bradford (1976). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.0). El extracto de hoja de 0.1 mL se mezcló con 1.0 mL de reactivo de Bradford. Se evaluó la absorbancia a 595 nm. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja referido a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA). El contenido de proteínas presente en el filtrado del

and 'Z 30 A'). The area of elliptical lesions resulting from 54 punctures/treatment (18 punctures/leaf) was evaluated, and three independent samples (one from each leaf) were used for each biochemical determination. Using these measurements, each plant was evaluated in the discriminant functions described by Companioni *et al.* (2005) to assess if they were accurately classified (Table 1).

As the lesion areas were measured in three groups of 18 lesions, and each biochemical determination was repeated three times, three sets of data were available for each plant in the original matrix. The three sets of data for each plant were assessed using the discriminant function for resistant clones and the discriminant function for susceptible clones. The obtained results were compared using the parametric t-test to determine statistical differences between the results of each function. The maximum probability of making a type I error was 0.05. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows, version 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997) was used for the statistical processing of the data. In addition, the evaluation procedure for *Fusarium* race 1 resistance in the 'Zanzíbar' clone lines, as described by Companioni *et al.* (2012), is presented below (Figure 1).

The study evaluated the resistance to *Fusarium* wilt caused by race 1 GCV [01210] in each assessed line and at every evaluation time using discriminant functions (Table 2). After applying the treatments as described and conducting biochemical analyses of the leaves from the 'Zanzíbar' clone lines, the discriminant functions classified 93.3% of the evaluated 'Z 30' mutant plants (56 out of 60) as resistant. Similarly, 91.6% of the evaluated 'Z 13' plants (55 out of 60) were classified as resistant, while 96.6% of the plants in line 'Z 30A' were classified as resistant (58 out of 60). These results suggest that the selected lines from the irradiated 'Zanzíbar' clone, namely 'Z 13', 'Z 30', and 'Z

cultivo del hongo se le restó al contenido total de proteínas determinado en las hojas, a las 48 horas después de la aplicación del filtrado del cultivo del hongo.

Cada tratamiento incluyó tres hojas de plantas diferentes en cada línea evaluada ('Z 13', 'Z 30' y el 'Z 30 A'). Se evaluaron las áreas de la lesión elíptica de 54 punteadura/tratamiento (18 punteadura/hoja) y cada determinación bioquímica implicó a tres muestras independientes (una de cada hoja). Con las mediciones citadas se evaluó cada planta en las funciones discriminantes descritas por Companioni *et al.* (2005) para conocer si eran clasificadas correctamente (Cuadro 1).

Como las áreas de las lesiones se habían medido en tres grupos de 18 lesiones cada uno, y cada determinación bioquímica se había repetido tres veces, entonces se disponía de tres juegos de datos por cada planta de la matriz original. Los tres juegos de datos de cada planta se evaluaron en la función discriminante para clones resistentes y en la función discriminante para clones susceptibles. Los resultados obtenidos se compararon mediante la prueba paramétrica t-test para conocer si los resultados de cada función eran estadísticamente diferentes. La probabilidad máxima de cometer error de tipo I fue 0.05. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para Windows, versión 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997). Por otra parte, el procedimiento descrito anteriormente para la evaluación de la resistencia por *Fusarium* raza 1 en las líneas del clon 'Zanzíbar' se presenta a continuación según Companioni *et al.* (2012) (Figura 1).

La evaluación de la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1 GCV [01210] en cada línea evaluada y en cada momento de evaluación según las funciones discriminantes se describen a continuación (Cuadro 2). Después de las 48 horas de la aplicación de los tratamientos descritos, y el posterior

**Table 1. Discriminant functions to differentiate banana clones resistant and susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 according to Companioni *et al.* (2005).****Cuadro 1. Funciones discriminantes para diferenciar clones de banano resistentes y susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 según Companioni *et al.* (2005).**

|                                         |                                                                                                                    |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Función para clones susceptibles</b> | <b>S:</b> 11.87 a + 66.73 b + 24.60 c + 13.47 d + 0.09 e + 51.60 f + 20.39 g - 16.85 h + 11.20 i - 11.13 j - 49.20 |
| <b>Función para clones resistentes</b>  | <b>R:</b> 18.94 a + 42.84 b + 7.45 c + 19.58 d + 3.84 e + 45.72 f + 15.79 g - 5.11h - 2.31i + 0.21j - 41.55        |

**Legend** (The fractions on the right correspond to the reciprocal of the larger value. These are constants in the discriminant functions):

a = Lesion area of leaves treated with uninoculated culture medium (mm<sup>2</sup>) \* 1/1.22 mm<sup>2</sup>

b = Lesion area of leaves treated with fungal culture filtrate (mm<sup>2</sup>) \* 1/48.84 mm<sup>2</sup>

c = Free phenol content in leaves treated with uninoculated culture medium (mg g<sup>-1</sup> fresh leaf mass) \* 1/43.13 mg phenols g<sup>-1</sup> fresh leaf mass.

d = Free phenol content in leaves treated with fungus culture filtrate (mg g<sup>-1</sup> fresh leaf mass) \* 1/27.51 mg phenols g<sup>-1</sup> fresh leaf mass.

e = Content of phenols bound to cell walls in leaves treated with uninoculated culture medium (mg g<sup>-1</sup> of fresh leaf mass) \* 1/118.51 mg g<sup>-1</sup> of fresh leaf mass.

f = Content of phenols bound to cell walls in leaves treated with fungus culture filtrate (mg g<sup>-1</sup> of fresh leaf mass) \* 1/103.73 mg g<sup>-1</sup> of fresh leaf mass.

g = Aldehyde content (except malondialdehyde) in leaves treated with uninoculated culture medium (μmol g<sup>-1</sup> fresh leaf mass) \* 1/1.06 μmol g<sup>-1</sup> fresh leaf mass.

h = Aldehyde content (except malondialdehyde) in leaves treated with fungus culture filtrate (μmol g<sup>-1</sup> of fresh leaf mass) \* 1/0.83 μmol g<sup>-1</sup> of fresh leaf mass.

i = Protein content in leaves treated with uninoculated culture medium (mg protein g<sup>-1</sup> fresh leaf mass) \* 1/5.88 mg g<sup>-1</sup> fresh leaf mass.

**Leyenda** (Las fracciones a la derecha corresponden al recíproco del valor mayor. Estas son constantes en las funciones discriminantes):

a = Área de la lesión de hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mm<sup>2</sup>) \* 1/1.22 mm<sup>2</sup>

b = Área de la lesión de hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mm<sup>2</sup>) \* 1/48.84 mm<sup>2</sup>

c = Contenido de fenoles libres en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/43.13 mg de fenoles g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

d = Contenido de fenoles libres en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/27.51 mg de fenoles g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

e = Contenido de fenoles ligados a las paredes celulares en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/118.51 mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

f = Contenido de fenoles ligados a las paredes celulares en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/103.73 mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

g = Contenido de aldehídos (excepto malondialdehído) en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (μmol g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/1.06 μmol g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

h = Contenido de aldehídos (excepto malondialdehído) en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (μmol g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/0.83 μmol g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

i = Contenido de proteínas en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mg de proteínas g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/5.88 mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

j = Contenido de proteínas en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mg de proteínas g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja) \* 1/4.85 mg g<sup>-1</sup> de masa fresca de la hoja.

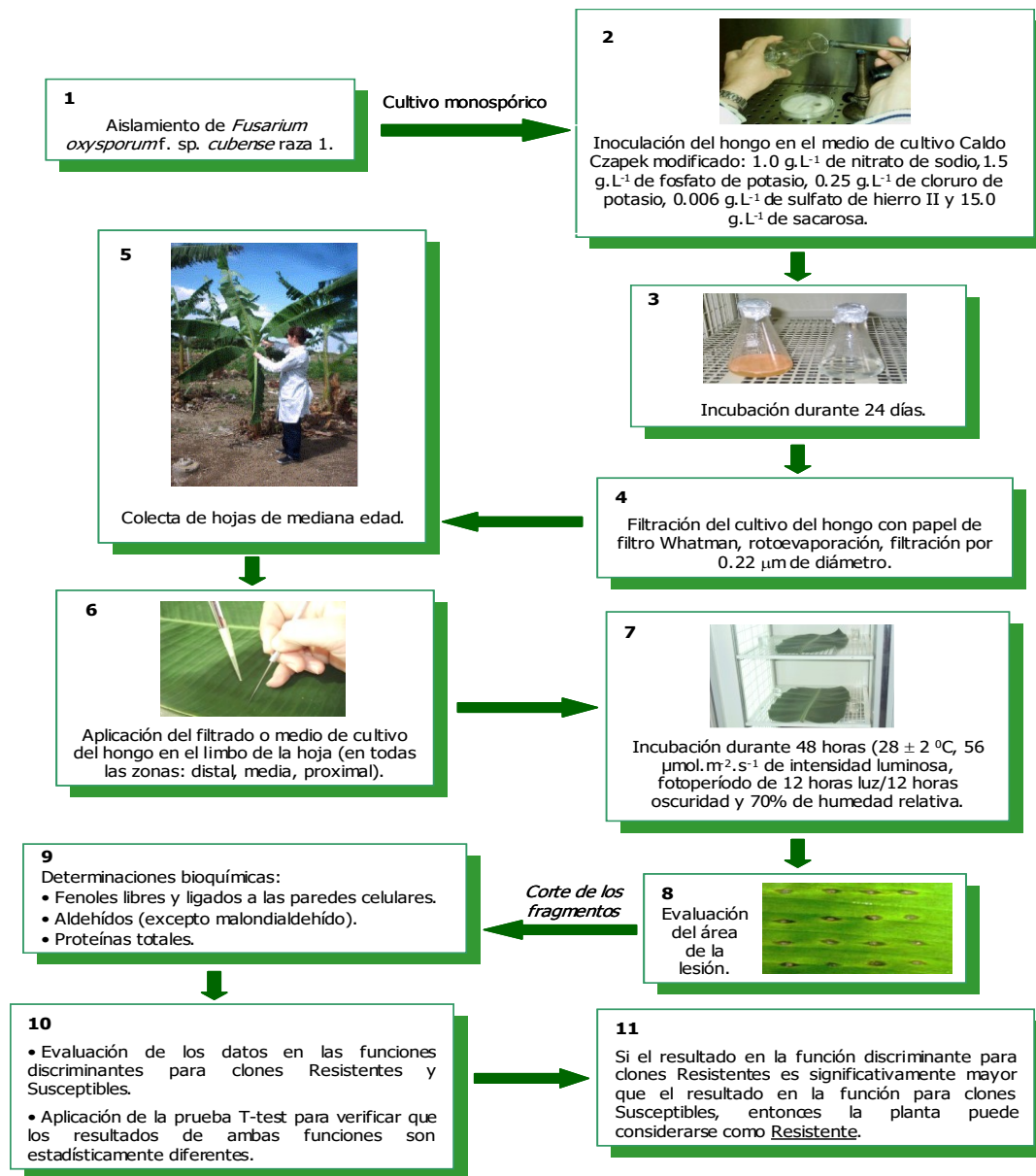


Figure 1. Method for leaf-level differentiation of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 in banana according to Companioni *et al.* (2012).

Figura 1. Método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 en banano según Companioni *et al.* (2012).

30A', may be promising materials for genetic improvement in cultivation focused on resistance to FOC race 1 GCV [01210]. However, to confirm the resistance observed in these lines, additional

análisis bioquímico en las hojas de las líneas del clon 'Zanzibar' se pudo observar que las funciones discriminantes clasificaron como resistente al 93.3% de las plantas evaluadas del mutante 'Z 30'

**Table 2. Classification into susceptible or resistant made by discriminant functions on selected lines of the irradiated ‘Zanzibar’ clone.**  
**Cuadro 2. Clasificación en susceptibles o resistentes hecha por las funciones discriminantes en las líneas seleccionadas del clon ‘Zanzibar’ irradiado.**

| Momentos de evaluación | Líneas evaluadas | Número total de plantas evaluadas | Número total de plantas potencialmente resistentes según funciones discriminantes |
|------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 1                      | ‘Z-30’           | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 2                      | ‘Z-30’           | 10                                | 8 (80%)                                                                           |
| 3                      | ‘Z-30’           | 10                                | 9 (90%)                                                                           |
| 4                      | ‘Z-30’           | 10                                | 9 (90%)                                                                           |
| 5                      | ‘Z-30’           | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 6                      | ‘Z-30’           | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 1                      | ‘Z-13’           | 10                                | 8 (80%)                                                                           |
| 2                      | ‘Z-13’           | 10                                | 9 (90%)                                                                           |
| 3                      | ‘Z-13’           | 10                                | 9 (90%)                                                                           |
| 4                      | ‘Z-13’           | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 5                      | ‘Z-13’           | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 6                      | ‘Z-13’           | 10                                | 9 (90%)                                                                           |
| 1                      | ‘Z-30A’          | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 2                      | ‘Z-30A’          | 10                                | 9 (90%)                                                                           |
| 3                      | ‘Z-30A’          | 10                                | 9 (90%)                                                                           |
| 4                      | ‘Z-30A’          | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 5                      | ‘Z-30A’          | 10                                | 10 (100%)                                                                         |
| 6                      | ‘Z-30A’          | 10                                | 10 (100%)                                                                         |

field studies are necessary. The first and most crucial step when assessing a new banana clone is evaluating resistance in plants against different ‘formae specialis’ of *Fusarium oxysporum* (Buddenhagen, 2009).

Even though *in vitro* resistance evaluations are performed, supposedly resistant plants require field studies (Dita *et al.*, 2018). In this context, Saraswathi *et al.* (2016) selected banana mutants of the Rasthali cultivar (Silk, AAB) for resistance to race 1 of GCV [0124/5] of FOC through *in vitro* selection. To achieve this, they used toxin (fusaric acid) and the pathogen’s culture filtrate (CF) as selection agents. Individual banana mutant shoots obtained after the third or fourth subculture were transferred to multiplication medium supplemented with different concentrations of the toxin

(56 plantas de 60). Mientras, que en la línea ‘Z 13’ se clasificaron como resistentes el 91.6% de las plantas evaluadas (55 plantas de 60). Por último, en la línea ‘Z 30A’ se observó que las funciones discriminantes en este cultivar clasificaron al 96.6% de las plantas como resistente (58 plantas de 60). Los resultados evidenciaron que las líneas seleccionadas del clon ‘Zanzibar’ irradiado (‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’) pueden ser materiales promisorios para el mejoramiento genético en el cultivo, dirigido a la resistencia a FOC raza 1 GCV [01210], donde su resistencia osciló del 91.6 al 96.6%. Sin embargo, no se descarta la necesidad de continuar estudios adicionales en campo para verificar la resistencia en las líneas evaluadas. El primero y más crucial de todos los pasos al evaluar un nuevo clon de banana consiste en la evaluación de la resistencia en

(commercial fusaric acid) (Sigma Aldrich, USA) (0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05, and 0.0625 mM) and 3, 4, 5, 6, 7, and 8% concentrations of the pathogen's CF, in addition to the growth regulator. After three weeks, they observed 50% survival of the explants at a concentration of 0.050 mM of the toxin and 7% with the fungal CF. At higher concentrations, there was a rapid decrease in banana mutant shoot growth. The selected mutants were transferred for pot tests under controlled conditions by inoculating the substrate with a spore suspension of  $12 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup> of the fungus for the next three months. After six months of resistance evaluation, three putatively resistant mutants to race 1 of FOC were obtained, which were massively multiplied *in vitro* for further interaction studies. It is important to note that determining the correct concentration of pathogen CF or toxin for the expression of differential phytotoxic activity between varieties is necessary for establishing resistance selection systems. This increases the chances of obtaining stable lines of plants with disease resistance (Portal *et al.*, 2021).

The findings of this study demonstrate that the selected lines of the irradiated 'Zanzibar' clone ('Z 13', 'Z 30', and 'Z 30 A') showed resistance to FOC race 1 GCV [01210] when evaluated at different selection times using the method described by Companioni *et al.* (2005; 2012) for differentiating susceptibility or resistance to *Fusarium* wilt. Additionally, the ease of evaluating resistance using the FC of the fungus and the reduced response time (48 hours) to determine plant susceptibility or resistance were also observed. Furthermore, this method facilitates the evaluation of a significant number of samples under laboratory conditions, enabling the acceleration of genetic improvement programs for this disease. These results highlight the potential of biotechnology in crop genetic improvement.

plantas frente a las diferentes '*formae specialis*' de *Fusarium oxysporum* (Buddenhagen, 2009).

Por otro lado, aunque se realicen evaluaciones de la resistencia *in vitro*, las plantas supuestamente resistentes deben someterse a estudios en campo (Dita *et al.*, 2018). En este sentido, Saraswathi *et al.* (2016) realizaron la selección de los mutantes de banano del cultivar Rasthali (Silk, AAB) con resistencia a la raza 1 del GCV [0124/5] de FOC mediante la selección *in vitro*. Para ello, utilizaron como agentes de selección toxina (ácido fusárico), y FC del patógeno. Los brotes individuales de los mutantes de banano obtenidos después del tercer o cuarto subcultivo fueron transferidos al medio de cultivo de multiplicación, suplementado con diferentes concentraciones de la toxina (ácido fusárico comercial) (Sigma Aldrich, EE. UU.) (0.0125; 0.025; 0.0375; 0.05 y 0.0625 mM); y a las concentraciones de 3; 4; 5; 6; 7 y 8% del FC del patógeno. Además, añadieron el regulador de crecimiento. Después de tres semanas observaron el 50% de supervivencia de los explantes en la concentración de 0.050 mM de la toxina; y 7% con el FC del hongo. En concentraciones superiores observaron una rápida disminución en el crecimiento de los brotes de los mutantes de banano. A los tres meses siguientes, los mutantes seleccionados fueron transferidos para realizar las pruebas en macetas, en condiciones controladas mediante la inoculación al sustrato con una suspensión de esporas de  $12 \times 10^9$  conidios mL<sup>-1</sup> del hongo. Posterior a los seis meses del proceso de evaluación de la resistencia obtuvieron tres mutantes putativos resistentes a la raza 1 de FOC. Los cuales fueron multiplicado *in vitro* de forma masiva para continuar otros estudios en la interacción. Es importante señalar que para el establecimiento de sistemas de selección de la resistencia la determinación de una concentración correcta del FC del patógeno o toxina, para la expresión de la actividad fitotóxica diferencial entre variedades es

## CITED LITERATURE

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buddenhagen IW. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. *Acta Horticulturae* 828: 193-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.828.19>
- Companioni B, Mora N, Díaz L, Pérez A, Arzola M, Espinosa P, Hernández M, Ventura J, Pérez MC, Santos R and Lorenzo JC. 2005. Identification of discriminant factors alter treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* culture filtrates. *Plant Breeding* 124: 79-85. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00997.x>
- Companioni B, Lorenzo JC and Santos R. 2012. Nuevo método para la diferenciación al Mal de Panamá en banano. Editorial Académica Española. <http://www.eae-publishing.com>
- Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG and Staver CP. 2018. *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science* 9: 1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- FAOSTAT. 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- García R, Portal N, Santos R, Rodríguez A and Companioni B. 2021. Mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39 (1): 122-146. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2008-2>.
- Gurr SJ, McPherson MJ and Bowles DJ. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In: D. L. Wilkinson (ed.). *Molecular plant pathology: a practical approach*. No. III, IRL Press, Oxford. Pp. 51-56.
- Heath RL and Packer I. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry Biophysics* 125: 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Pascual MR, CM Pereda and Pérez R. 1983. Inverse correlation between estrogen receptor and peroxidase activity in human mammary tumor. *Neoplasma* 30: 611.
- Porrás RJ. 1991. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. In: H. Scheer (ed.). *Chemistry of chlorophyll*. CRC. Press Inc. Boca Raton Ann Arbor Boston London. Pp. 320.
- Portal N, Soler A, Ribadeneira C, Solano J, Portieles R, Herrera L, Companioni B, Borrás O and Santos R. 2021. Phytotoxic metabolites produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2. *Frontiers in Microbiology* 12: 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629395>

necesaria. Lo cual incrementa las posibilidades de obtener líneas estables de plantas con resistencia a las enfermedades (Portal *et al.* 2021). Como se puede mostrar, aunque se realicen selecciones *in vitro* las plantas supuestamente resistentes deben someterse a estudios en campo.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las líneas seleccionadas del clon 'Zanzíbar' irradiado ('Z 13', 'Z 30' y el 'Z 30 A') evaluadas en los diferentes momentos de la selección mostraron resistencia a FOC raza 1 GCV [01210] según el método para la diferenciación de la susceptibilidad o resistencia a marchitez por *Fusarium* descrito por Companioni *et al.* (2005; 2012). Por otra parte, se evidencia la facilidad para realizar el trabajo de evaluación de la resistencia con FC del hongo; así como la reducción del tiempo necesario de respuesta para conocer si una planta es resistente o susceptible (48 horas). Por último, permite evaluar un número importante de muestras en condiciones de laboratorio, y de esta manera acelerar los programas de mejoramiento genético a esta enfermedad. Lo cual evidencia el potencial de la biotecnología en el campo del mejoramiento genético en el cultivo.

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

- Saraswathi M, Kannan G, Uma S, Thangavelu R and Backiyarani S. 2016. Improvement of banana cv. Rasthali (Silk, AAB) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (VCG 0124/5) through induced mutagenesis: Determination of LD50 specific to mutagen, explants, toxins and *in vitro* and *in vivo* screening for *Fusarium* wilt resistance. *Indian Journal of Experimental Biology* 54: 345-353. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Ventura JC, López J, Rodríguez S, Medero V, González L, Ventura V, Vázquez D, Torres M, Montano N, Gálvez J, Valdés M and Triana O. 2015. Obtención de mutantes de porta bajo por irradiaciones en el cultivar 'Zanzíbar' (*Musa* spp, grupo AAB). *Revista Agricultura Tropical* 1 (1): 39-50.

# *Diaporthe* sp. and *Lasiodiplodia* sp.: New foliar pathogens in cuajinicuil and soursop in Oaxaca, Mexico

## *Diaporthe* sp. y *Lasiodiplodia* sp.: nuevos patógenos foliares de cuajinicuil y guanábana en Oaxaca, México

**Javier Castillo-Cabrera**, <sup>1</sup>Instituto Tecnológico del Valle de Etlá, Nudo San Sebastián Nopalera, Oaxaca, CP 71162, México; **Román González-Escobedo**, Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Periférico Francisco R. Almada km 1, Chih, Chihuahua, CP 31453, México; **Noé Bautista-Hernández**<sup>1</sup>, **José Luis Barrios-Bautista**<sup>1</sup>, **Graciela Dolores Ávila-Quezada**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas. Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Campus I s/n, Chih., Chihuahua, CP 31350, México; **Laila Nayzzel Muñoz-Castellanos**\*, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Campus II Circuito Universitario s/n, Chih., Chihuahua, CP 31125, México.

\*Corresponding autor: [lmunoz@uach.mx](mailto:lmunoz@uach.mx)

Received: January 13, 2023.

Accepted: April 24, 2023.

Castillo-Cabrera J, González-Escobedo R, Bautista-Hernández N, Barrios-Bautista JL, Ávila-Quezada GD and Muñoz-Castellanos LN. 2023. *Diaporthe* sp. and *Lasiodiplodia* sp.: New foliar pathogens in cuajinicuil and soursop in Oaxaca, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 298-309.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2301-1>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

**Abstract.** Cuajinicuil (*Inga spuria*) and soursop (*Annona muricata*) fruit trees presented leaf spots that reached a severity of 50% in June 2019. The present study was established with the aim of identifying through ITS the fungi of the foliage of both trees. For this purpose, 10 orchards per fruit tree were selected in Peña Negra, Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, Mexico, where five

**Resumen.** Los árboles frutales de cuajinicuil (*Inga spuria*) y guanábana (*Annona muricata*) presentaron manchas foliares que alcanzaron una severidad del 50% en junio del 2019. El presente estudio se estableció con el objetivo de identificar a través de la secuenciación del ITS a los hongos asociados al follaje de ambos árboles. Para ello se seleccionaron 10 huertas por frutal en Peña Negra, Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, México, en donde se colectaron cinco hojas sintomáticas por huerta. Los hongos aislados de cuajinicuil presentaron conidios ovoides, aseptados y hialinos. Los conidios aislados de guanábana fueron subovoides a elipsoidales, con ápices redondeados, hialinos y aseptados (inmaduros), con un septo y color café (maduros). Los postulados de Koch se realizaron en hojas sanas de ambos frutales, en 10 cámaras húmedas por frutal. Una vez demostrada su patogenicidad se identificaron molecularmente. En cuajinicuil se identificó a *Diaporthe* sp. (NCBI:



symptomatic leaves per orchard were collected. Fungi isolated from cuajinicuil presented ovoid, aseptate and hyaline conidia. The conidia isolated from soursop were subovoid to ellipsoidal, with rounded apices, hyaline and aseptate (immature), with a septum and brown in color (mature). Koch's postulates were carried out on healthy leaves of both fruit trees, in 10 moist chambers per each. Once their pathogenicity was demonstrated, isolates were identified. In cuajinicuil *Diaporthe* sp. (NCBI: MW418007) and in soursop to *Lasiodiplodia* sp. (NCBI: MW418003) were identified. These species are reported for the first time in the fruit trees of this community. These findings represent a scientific contribution for the benefit of small agricultural communities in Mexico.

**Keywords:** *Inga spuria*, *Annona muricata*, Internal transcribed spacer (ITS), *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*.

Most of the rural communities in Oaxaca, Mexico, currently maintain elements from prehispanic agricultural systems, such as the organization that promotes community work and the production of local crops. Fruit trees such as *Inga spuria* (cuajinicuil) and *Annona muricata* (soursop) are among the main socially and economic important species grown in the community of Peña Negra, in the county of Santa Lucía Monteverde, Oaxaca. The community is located at an altitude of 1200 masl, its average temperature is 26 °C and a relative humidity varies between 50 and 90% throughout the years. The production of soursop in Peña Negra is of 0.25 t a year, and for cuajinicuil, 0.5 t a year. This production is for self-supply and is also sold in the local market.

In June, 2019, these two fruit trees first displayed fungal symptoms on leaves, causing heavy defoliation, mummification and loss of fruits, with

MW418007) y en guanábana a *Lasiodiplodia* sp. (NCBI: MW418003). Estas especies se reportan por primera vez en los árboles frutales de esta comunidad. Estos hallazgos representan un aporte científico en beneficio de pequeñas comunidades agrícolas de México.

**Palabras clave:** *Inga spuria*, *Annona muricata*, región espaciadora transcrita interna (ITS), *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*.

En la actualidad, la mayoría de las comunidades rurales de Oaxaca, México mantienen elementos de los sistemas agrícolas prehispánicos tales como la organización que promueve el trabajo comunitario y la producción de cultivos locales. Frutales como *Inga spuria* (cuajinicuil) y *Annona muricata* (guanábana) son de las principales especies de importancia social y económica que se cultivan en la comunidad de Peña Negra, municipio de Santa Lucía Monteverde, Oaxaca. La comunidad está localizada a una altitud de 1200 msnm, tiene temperaturas promedio de 26 °C y humedad relativa que varía de 50 a 90% a lo largo del año. La producción de guanábana es de 0.25 t anuales y de cuajinicuil 0.5 t por año en Peña Negra. Esta producción se destina para autoconsumo y se comercializa en el mercado local.

En junio de 2019 en estos dos frutales se observaron por primera vez síntomas foliares fúngicos causando fuerte defoliación, momificación y caída del fruto, con una incidencia del 100%, es decir, todos los árboles tenían hojas enfermas. En un recorrido en las siete rancherías de San Sebastián, Nopalera: El paraíso 16° 95' 27'' N, 97° 82' 11'' O, El guayabo 16° 92' 33'' N, 97° 78' 13'' O, Buena Vista el Naranjo 16° 92' 75'' N, 97° 76' 69'' O, Peña Flor de Clavo 16° 90' 19'' N, 97° 77' 91'' O, Peña Negra 16° 91' 52'' N, 97° 79' 50'' O, Torralba

an incidence of 100%, meaning that all trees had diseased leaves. In a tour of the seven *rancherías* of San Sebastián, Nopalera (El paraíso 16° 95' 27'' N, 97° 82' 11'' W, El guayabo 16° 92' 33'' N, 97° 78' 13'' W, Buena Vista el Naranjo 16° 92' 75'' N, 97° 76' 69'' W, Peña Flor de Clavo 16° 90' 19'' N, 97° 77' 91'' W, Peña Negra 16° 91' 52'' N, 97° 79' 50'' W, Torralba de Juárez 16° 90' 47'' N, 97° 82' 19'' O, and Peña de Jícara 16° 93' 86'' N, 97° 79' 50'''), the same symptoms were observed in both fruit tree species.

A part of Putla (a district that spans 50 communities and several municipal areas) was also visited, and the same symptoms were also observed in soursop and cuajinicuil in these communities, namely Yosotiche, Simiyuvi and El Piñal. Each *ranchería* has its own microclimate and the pathogens have seemed to adapt to them all. Out of all the families in the area, 95% have few trees planted in their backyards. The remaining 5% has between 50 and 100 of both types of fruit trees. In diseased trees, losses can be of up to 50%, according to information provided by local farmers. In order to understand this phytosanitary problem, the aim of this study was to identify, by amplification and analysis of the region of the Internal Transcribed Spacer (ITS), the fungi associated to the foliage of the cuajinicuil and soursop.

The diseased plant tissue samples were collected from cuajinicuil and soursop trees in December, 2019, in 10 orchards in Peña Negra, San Sebastián Nopalera, in the county of Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, Mexico (16° 54' 52.73'' N; 97° 47' 50.35'' W; 1096 masl). The location has an average temperature of 26 °C and the relative humidity between May and October fluctuates between 80 and 90%.

The trees were in a vegetative phenological stage. The orchards chosen had 1 ha for every kind of fruit tree to carry out the sampling. In each orchard,

de Juárez 16° 90' 47'' N, 97° 82' 19'' O, y Peña de Jícara 16° 93' 86'' N, 97° 79' 50'', se observaron los mismos síntomas en ambos frutales.

También se recorrió parte de Putla (distrito que abarca a 50 comunidades y diversos municipios) y se observaron los mismos síntomas en guanábana y cuajinicuil en las comunidades visitadas: Yosotiche, Simiyuvi y El Piñal. Cada *ranchería* tiene su propio microclima y al parecer los patógenos se han adaptado a todos. El 95% de las familias tienen pocos árboles como cultivos de traspatio. El 5% restante tiene entre 50 a 100 árboles de ambos frutales. En los árboles enfermos las pérdidas pueden alcanzar un 50% de acuerdo con información personal de los productores. Con la finalidad de atender este problema fitosanitario, el objetivo de este trabajo fue identificar a través de la amplificación y análisis de la región espaciadora transcrita interna (ITS) los hongos asociados al follaje de cuajinicuil y guanábana.

Las muestras de tejido vegetal enfermo se recolectaron de árboles de cuajinicuil y guanábana en diciembre de 2019, en 10 huertas en la *ranchería* de Peña Negra, San Sebastián Nopalera, municipio de Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, México (16° 54' 52.73'' N; 97° 47' 50.35'' O; 1096 msnm). La localidad tiene una temperatura promedio de 26 °C y la humedad relativa entre mayo y octubre oscila entre 80 a 90%.

Los árboles se encontraban en etapa fenológica vegetativa. Se seleccionaron huertas de 1 ha por frutal para realizar los muestreos. En cada huerta se estableció un diseño de muestreo aleatorio de 10 árboles con síntomas foliares. De cada árbol se recolectaron al azar a una altura de 1.5 m, cinco hojas con síntomas. Para aislar los microorganismos, después de enjuagar las hojas en el laboratorio, porciones de 0.5 x 0.5 cm tomados del margen de la lesión se sumergieron por 1 min en hipoclorito de sodio al 2%, se enjuagaron tres veces, y se colocaron

a randomized sampling design was established consisting of 10 trees with leaf symptoms. Five leaves with symptoms were taken from each tree at a height of 1.5 m. To isolate the microorganisms, after rinsing the leaves in the lab, pieces measuring 0.5 x 0.5 cm were taken from the edge of the lesions and submerged in 2% sodium hypochlorite, rinsed three times and placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA; BD Bioxon) and incubated at 27 °C for seven days. From the fungal growth, hypha tips were replanted until pure cultures were obtained from each isolation.

The pathogenicity tests were carried out in 10 healthy soursop plants, placing them in 10 humid chambers, separately, and keeping them at 25 °C. Each one was inoculated placing a disc, 5 mm in diameter. The negative control was inoculated with sterile distilled water and monitored until symptoms appeared.

In cuajinicuil, to verify the pathogenicity of the isolation, the previously described methodology was followed. In addition, leaves from 10 plants at a height of 30 cm were inoculated, one leaf per plant, which were kept at a temperature of 25 °C and the humidity was maintained with moistened cotton inside the humid chambers. Once the symptoms appeared, the pathogens were isolated from the diseased tissue in the PDA. The two fungi isolated from each tree were morphologically different, therefore the sequencing of each one's ITS was carried out.

The genomic DNA was extracted from the mycelial growth of the pure culture of each isolation using the kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA), following the manufacturer's protocol. The concentration and purity of the DNA was verified in a Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA); the integrity was determined by electrophoresis in a 1% agarose

en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA; BD Bioxon) y se incubaron a 27 °C por siete días. A partir del crecimiento fúngico se hicieron resiembras de punta de hifa hasta obtener cultivos puros de cada aislado.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en 10 hojas de guanábana sanas, colocándolas en 10 cámaras húmedas por separado, manteniéndolas a 25 °C. Cada una de ellas se inoculó colocando un disco con micelio de 5 mm de diámetro. El control negativo se inoculó con agua destilada estéril y se monitorearon hasta la aparición de síntomas.

En cuajinicuil, para verificar la patogenicidad del aislado se siguió la metodología anteriormente descrita. Además, se inocularon hojas de 10 plantas de 30 cm de altura. Una hoja por planta, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 25 °C y la humedad se mantuvo con algodón húmedo dentro de las cámaras húmedas. Una vez que aparecieron los síntomas, a partir del tejido enfermo se aislaron los patógenos en PDA. Los dos hongos aislados de cada cultivo fueron diferentes morfológicamente, por lo tanto, se realizó la secuenciación del ITS de cada uno.

El ADN genómico se extrajo a partir del crecimiento micelial de los cultivos puros de cada aislado con el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA) siguiendo el protocolo del proveedor. La concentración y pureza del ADN se verificó en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA); la integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher, Darmstadt, Alemania).

La región ITS se amplificó con los iniciadores universales ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) en un termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

gel stained with SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher, Darmstadt, Germany).

The ITS region was amplified with universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) in a T100 Bio-Rad thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a total reaction volume of 25  $\mu$ L, containing 50-100 ng of genomic DNA, 0.4  $\mu$ M of each primer and 1X of Platinum Green Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction conditions were as follows: initial denaturalization at 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 1 min, aligning at 55 °C for 2 min, extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 5 min. The expected fragment (550 pairs of bases) was corroborated by electrophoresis in 1% agarose gel and purified using the ZR DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). The purified products of PCR were sequenced using Sanger's technique by Macrogen, Inc. (South Korea).

The sequences from this study were compared individually with reference sequences from the GenBank data base (NCBI) with the program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Later, the program Clustal X v2.1 was used to carry out the multiple sequence alignment. Once aligned, 5' and 3' were timed using SeaView v4.4.2 and the best nucleotide substitution model was determined using the program SMS (Smart Model Selection) incorporated in PhyML v3.0. A phylogenetic tree was calculated using the maximum likelihood method in PhyML v3.0 with the model TN93. The reliability of each node was estimated using a bootstrap analysis after 1000 replications and the sequence of *Alternaria alternata* KX377683.1 was included as an external group. The generated tree was visualized with the program iTOL (Interactive Tree of Life).

en un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L, conteniendo 50-100 ng de ADN genómico, 0.4  $\mu$ M de cada iniciador y 1X de Platinum Green Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 2 min, extensión a 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C por 5 min. El fragmento esperado (550 pares de bases) se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó con el kit ZR DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). Los productos purificados de PCR se secuenciaron por la técnica de Sanger, por la empresa Macrogen, Inc. (Corea del Sur).

Las secuencias de este estudio, se compararon individualmente con secuencias de referencia de la base de datos del GenBank (NCBI) con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente, el programa Clustal X v2.1 se utilizó para realizar el alineamiento múltiple de secuencias. Una vez alineadas, se recortaron de sus extremos 5' y 3' con SeaView v4.4.2 y se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica con el programa SMS (Smart Model Selection) incorporado en PhyML v3.0. Un árbol filogenético se calculó con el método de máxima verosimilitud en PhyML v3.0 con el modelo TN93. La confiabilidad de cada nodo se estimó por medio de análisis de bootstrap después de 1000 réplicas y se incluyó la secuencia de *Alternaria alternata* KX377683.1 como grupo externo. El árbol generado se visualizó en el programa iTOL (Interactive Tree of Life).

En cuajinicuil, los síntomas de la enfermedad fueron manchas pequeñas redondas a irregulares, de color castaño claro a oscuro con halo clorótico, sobre cualquier parte del foliolo. Las manchas se presentan en agrupaciones que llegan a formar pequeñas áreas de tejido necrosado. Las lesiones abarcan más del 50% del foliolo, finalmente las

In the cuajinicuil, the symptoms of the disease were small round to irregular spots with a light to dark chestnut color and a chlorotic halo on any part of the leaflet. The spots appeared in clusters that formed small areas of necrotized tissue. The lesions cover over 50% of the leaflet, and finally, the leaves become yellow and fall (Figure 1). The foliar symptoms in soursop have a brown color with irregular yellow edges that begin at the tip and spread towards the base of the leaflet. The necrotized tissue becomes brittle, followed by the wilting of the leaves, which then become brown, with an appearance of having been burned by fire. The branches become completely defoliated.

hojas se tornan amarillas y se defolian (Figura 1). Los síntomas foliares en guanábana tienen una coloración marrón con margen amarillo, irregulares, inician en la punta y avanzan hacia la base del foliolo. El tejido necrosado se vuelve quebradizo, después las hojas se marchitan, se tornan cafés con apariencia de quemadura por fuego. Las ramas se defolian por completo.

En cuajinicuil, el hongo sujeto a los postulados de Koch indujo síntomas a los 13 días después de la inoculación en plantas, mientras que en hojas desprendidas los síntomas se presentaron 10 días después de ser inoculadas. Las hojas presentaron manchas redondas a irregulares amarillentas



Figure 1. Leaf symptoms in fruit trees in the community of San Sebastián Nopalera, Oaxaca, Mexico. A-B. Symptoms of necrotic leaf in Cuajinicuil trees; C. Defoliation in cuajinicuil; D-E-F. Symptoms of lesions with yellowing and brown spots in soursop trees.

Figura 1. Síntomas foliares en árboles frutales de la comunidad de San Sebastián Nopalera, Oaxaca, México. A-B. Síntomas de necrosamiento foliar en árboles de Cuajinicuil; C. Defoliación en cuajinicuil; D-E-F. Síntomas de lesiones con amarillamiento y puntos de color café en árboles de Guanábana.

In cuajinicuil, the fungus subjected to Koch's postulates induced symptoms 13 days after inoculation in plants, whereas in loose leaves, the symptoms appeared 10 days after inoculation. The leaves displayed round to irregular yellowish spots, characteristic of the original disease. When the fungi of both tests were reisolated, they were confirmed to be similar to the initially isolated fungi. The 8.5 cm growth of the culture was achieved in seven days. The culture's characteristics are described in Table 1.

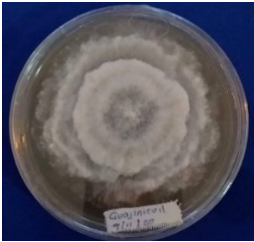

For soursop, the inoculated fungus induced similar symptoms to those initially observed in the field, 10 days after inoculation. The spots were maroon with yellow edges and irregularly shaped. When reisolating, the fungus displayed similarity with the initially isolated fungi. The culture's growth characteristics (Table 1) coincide with those reported by Picos-Muñoz *et al.* (2015) described for the fungus *Lasiodiplodia theobromae* obtained from papaya.

características de la enfermedad original inicial. Al reaislar los hongos de ambas pruebas se confirmó que fueron similares a los hongos aislados inicialmente. El crecimiento de 8.5 cm de la colonia se logró en siete días. Las características de la colonia se describen en el Cuadro 1.

En guanábana, el hongo inoculado indujo síntomas similares a los observados en inicialmente en campo, 10 días después de la inoculación. Las manchas fueron color marrón con margen amarillo e irregulares. En el reaislamiento, el hongo mostró similitud con el aislado inicialmente. Las características del crecimiento de la colonia (Cuadro 1) coinciden con las reportadas por Picos-Muñoz *et al.* (2015) descritas para el hongo *Lasiodiplodia theobromae* obtenido de papaya.

Los hongos aislados de cuajinicuil presentaron conidios ovoides, aseptados y hialinos, mientras que los conidios del hongo de guanábana fueron subovoides a elipsoidales, con ápices redondeados, hialinos y aceptados (inmaduros), con un septo y color café (maduros).

**Table 1. Nomenclature, taxonomic assignment and characteristics of the cuajinicuil and soursop pathogenic fungi.**  
**Cuadro 1. Nomenclatura, asignación taxonómica y características de los hongos patógenos de cuajinicuil y guanábana.**

| Fruit tree  | Strain/NCBI accession number | Genus   | Culture characteristics   | Colonies in PDA   |
|-------------|------------------------------|---|---|---|
| Cuajinicuil | HCUA1/MW418007               | <i>Diaporthe</i> sp.<br>(Sordariomycetes, Diaporthaceae)          | Aerial mycelia growth in cream concentric rings with lobulated edge and the vegetative growth in gray. After few days, mycelium becomes cottony and dense, grayish sepia color on the reverse |  |
| Soursop     | HGUA1/MW418003               | <i>Lasiodiplodia</i> sp.<br>(Dothideomycetes, Botryosphaeriaceae) | White dense aerial mycelia. Few days later, the mycelia turns olive gray to dark gray.  |  |

The fungi isolated from cuajinicuil displayed ovoid, septated and hyaline conidia, whereas the conidia of the fungus found in soursop were subovoidal to ellipsoidal, with rounded, hyaline and aseptate apices (immature), with a septum and brown in colored (mature).

The DNA sequences obtained from the isolated fungi displayed percentages of identity of 99% after performing a BLAST in NCBI for the genera *Diaporthe* and *Lasiodiplodia*. Based on the phylogenetic analysis of the ITS region, the phylogenetic relation of the isolates with sequences deposited in the GenBank data base was determined, resulting in the identification of *Diaporthe* sp. from the fungus isolated from cuajinicuil, and *Lasiodiplodia* sp. for the fungus isolated from soursop (Figure 2). The nucleotidic sequences of both pathogens were deposited in the GenBank data base, where they were given an accession number (Table 1).

The species of *Diaporthe* (*Phomopsis*) can be phytopathogenic, endophytic or saprophytic, in a wide range of hosts and new species were recently reported in diverse regions (Sun *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2020). The fungus causes the rotting of roots and fruits, canker, leaf spots, dieback and wilting (Gomes *et al.*, 2013); in citrus fruits it causes melanosis, peduncle rot and gummosis (Guarnaccia and Crous, 2018; Mondal *et al.*, 2007). To date there are no reports of this fungus affecting cuajinicuil. *Diaporthe* may have been related to the tree as an epiphyte, and in certain weather conditions, the fungus started to behave as a pathogen. In a thorough revision of recent investigations, no reports were found on the presence of *Diaporthe* on cuajinicuil crops causing leaf symptoms. An important aspect of this genus is that, being endophytic, they can occasionally behave as opportunist pathogens of the plants. An example of this is *D. foeniculina*, which is endophytic and an opportunist pathogenic

Las secuencias de ADN obtenidas a partir de los hongos aislados presentaron porcentajes de identidad de 99% después de realizar un BLAST en NCBI para los géneros *Diaporthe* y *Lasiodiplodia*. Con base en el análisis filogenético de la región ITS se determinó la relación filogenética de los aislados con secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, resultando en la identificación de *Diaporthe* sp. para el hongo aislado de cuajinicuil, y *Lasiodiplodia* sp. para el hongo aislado de guanábana (Figura 2). Las secuencias nucleotídicas de ambos patógenos fueron depositadas en la base de datos del GenBank donde se les asignó un número de acceso (Cuadro 1).

Las especies de *Diaporthe* (*Phomopsis*) pueden ser fitopatógenos, endófitos o saprofitos, en una amplia gama de hospedantes, además nuevas especies se reportan recientemente en diversas regiones (Sun *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2020). El hongo causa pudrición de raíces y frutos, cancro, manchas foliares, muerte descendente y marchitez (Gomes *et al.*, 2013), en cítricos causa melanosis, pudrición del pedúnculo y gomosis (Guarnaccia y Crous, 2018; Mondal *et al.*, 2007). Hasta la fecha no hay reportes de este hongo afectando cuajinicuil. *Diaporthe* pudo haber estado asociado al árbol como epífita, y ante ciertas condiciones climáticas, el hongo se empezó a comportar como patógeno. En revisión exhaustiva de investigaciones recientes, no se encontraron reportes de la presencia *Diaporthe* en el cultivo de cuajinicuil, causando síntomas foliares. Un aspecto interesante de este género es que, siendo endófitos, en ocasiones pueden comportarse como patógenos oportunistas de las plantas. Un ejemplo de ello es *D. foeniculina*, el cual es endófito y patógeno oportunista en diversas malezas, en plantas ornamentales y árboles frutales (Mondal *et al.*, 2007). Este hallazgo de este género en cuajinicuil representa un aporte importante para el manejo del hongo en el frutal, en las pequeñas comunidades rurales de Oaxaca, México.

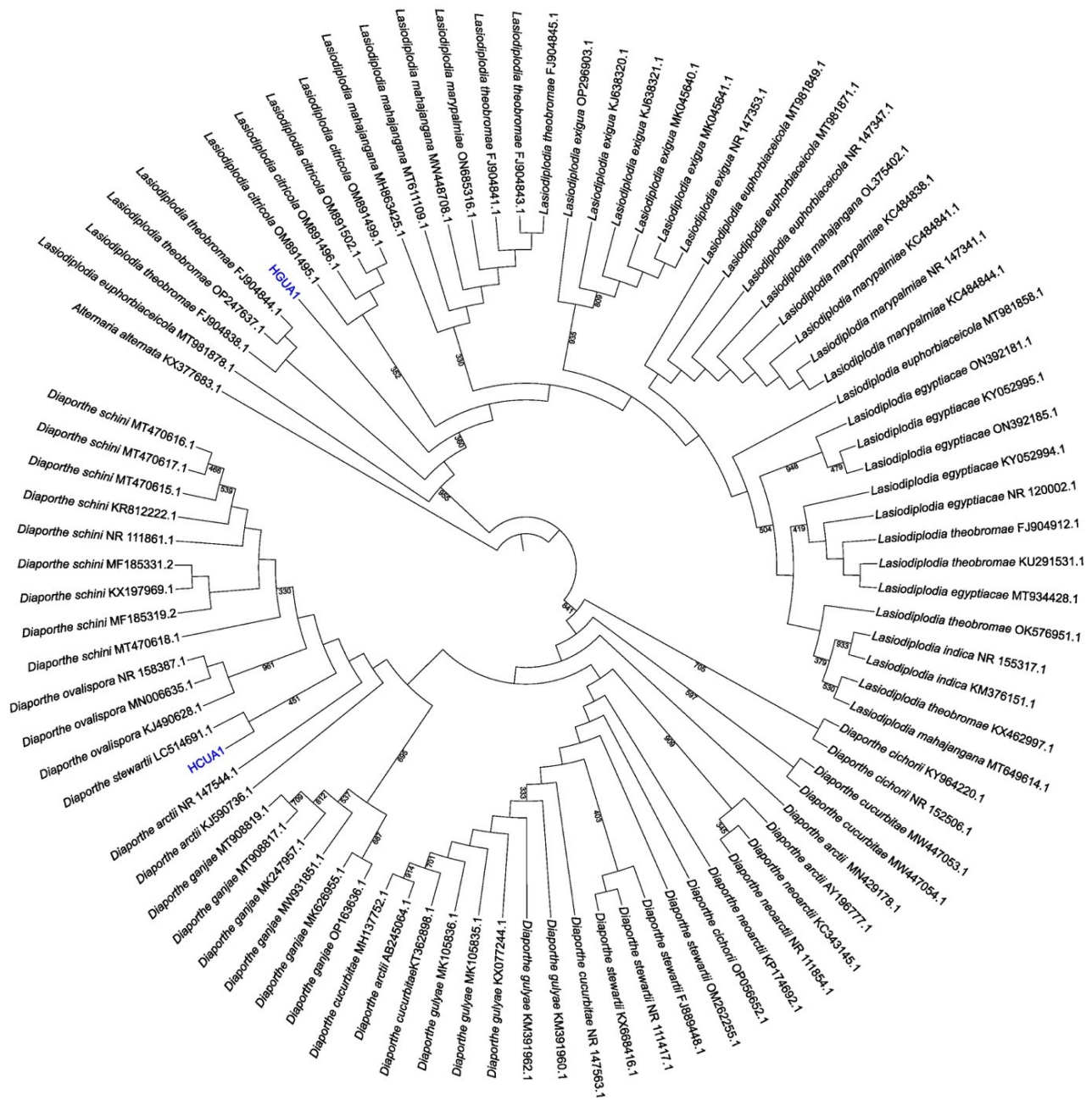


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree for the *Diaporthe* sp. fungus from cuajinicuil (HCUA1) and *Lasiodiplodia* sp. isolated from soursop (HGUA1). *Alternaria alternata* (KX377683.1) was used as an external group. The reliability in each node was evaluated using 1000 bootstrap replications. The isolations indicated in this study are marked blue.

Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de los hongos *Diaporthe* sp. recuperado de cuajinicuil (HCUA1) y *Lasiodiplodia* sp. aislado de guanábana (HGUA1). *Alternaria alternata* (KX377683.1) se utilizó como grupo externo. La confiabilidad en cada nodo se evaluó mediante 1000 réplicas de bootstrap. Los aislados indicados en este estudio están marcados en azul.



in several weeds, ornamental plants and fruit trees (Mondal *et al.*, 2007). This finding in cuajinicuil genus represents an important contribution for the management of the fungus in fruit trees in small rural communities of Oaxaca, Mexico.

Some of the symptoms caused by diverse *Lasiodiplodia* species have been reported to be canker, gummosis, dieback, leaf blight and crown damage in several crops (Shahbaz *et al.*, 2009). Many pathogens have a latent stage in their life cycle and cause no symptoms in their hosts. Salvatore *et al.* (2020) mention that the duration of the latent stage is highly variable, and the pathogenic change may depend on changes in the susceptibility of the host (some kind of stress), that may unleash a more aggressive behavior in the pathogen. The members of Botryosphaeriaceae are known to be latent pathogens of many hosts (Sakalidis *et al.*, 2011; Slippers *et al.*, 2007). In addition, a characteristic of *Lasiodiplodia* spp. is that it easily adapts to tropical and subtropical areas (Mehl *et al.*, 2017), such as the microclimates of Oaxaca; the increase in temperature can even generate the expansion of the range of hosts.

*Lasiodiplodia theobromae* has been reported to affect crops such as limes (Valle-De la Paz *et al.*, 2019), cacao, avocado, banana, peach (Picos-Muñoz *et al.*, 2015) and others. In the particular case of soursop, *L. theobromae* was identified as the causal agent of the rotting of fruits in Nayarit, Mexico by Cambero-Ayón *et al.* (2019), and in Mauritius island by Lutchmeah (1988), although these authors did not perform their studies on leaves. The morphological characteristics of *Lasiodiplodia*, isolated in this study coincide with those for the species *L. theobromae*, although morphologic (culture and conidial characteristics) and molecular studies are required, with the use of more genetic markers (26S rRNA, calmodulin and  $\beta$ -tubulin) to identify them at the level of species.

Se ha reportado que algunos de los síntomas causados por diversas especies de *Lasiodiplodia* son cancro, gomosis, muerte regresiva, tizón foliar y daño en la corona en diversos cultivos (Shahbaz *et al.*, 2009). Muchos patógenos tienen una etapa latente en su ciclo de vida y no causan síntomas en su hospedante. Salvatore *et al.* (2020) mencionan que la duración de la etapa latente es muy variable, y el cambio patogénico puede depender de cambios en la susceptibilidad del hospedante (algún tipo de estrés), que pueden desencadenar un comportamiento más agresivo en el patógeno. Es conocido que los miembros de Botryosphaeriaceae son patógenos latentes de muchos hospedantes (Sakalidis *et al.*, 2011; Slippers *et al.*, 2007). Además, una característica de *Lasiodiplodia* spp. es que se adapta fácilmente en regiones tropicales y subtropicales (Mehl *et al.*, 2017) como los microclimas de Oaxaca; incluso, el aumento de la temperatura puede generar la expansión del rango de hospedantes.

Se ha reportado a *Lasiodiplodia theobromae* afectando cultivos como lima (Valle-De la Paz *et al.*, 2019), cacao, aguacate, plátano, durazno (Picos-Muñoz *et al.*, 2015) entre otros. En el caso particular de guanábana, *L. theobromae* se identificó como agente causal de pudriciones en fruto en Nayarit, México por Cambero-Ayón *et al.* (2019), y en la Isla Mauricio por Lutchmeah (1988), aunque estos autores no realizaron estudios en follaje. Las características morfológicas de *Lasiodiplodia* aislado en este estudio coinciden con las de la especie *L. theobromae*, sin embargo, se requiere analizar morfológica (características de colonia y conidios) y molecularmente, con el uso de más marcadores genéticos (26S ARNr, calmodulina y  $\beta$ -tubulina) para lograr su identificación a nivel de especie.

Este estudio representa un primer acercamiento a los hongos que afectan el follaje de árboles de guanábana y cuajinicuil. La identificación de los organismos causales de una enfermedad

This study is the first approach to fungi that affect the leaves of soursop and cuajinicuil trees. The identification of the causal organisms of a disease initially helps design its integrated management. Both diseases are causing a severity of 50% in each crop. The scattering and emergence of phytopathogens in new regions in which there were no reports of its presence is a commitment to explore them, and after identifying them, establishing phytosanitary control plans to contribute to the integrated management of the crop. This work is a baseline to carry out more profound studies of fungi that limit the production of food in small communities in the country. It is therefore important to broaden the sampling to other fields of the same region, as well as the microscopic revision of more fungal isolations, whose genes that codify for the elongation factor 1- $\alpha$  (TEF 1- $\alpha$ ) and  $\beta$ -Tubulin ( $\beta$ -Tub) will be analyzed.

According to Koch's postulates and the molecular identification, *Diaporthe* sp. was associated as a leaf pathogen for cuajinicuil in Peña Negra, San Sebastián Nopalera, Oaxaca. On the other hand, leaf symptoms in soursop were identified as having been caused by *Lasiodiplodia* sp. in the same location of Oaxaca, where these are backyard crops.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the Valley of Etna Institute of Technology and the School of Chemical Science of the Autonomous University of Chihuahua for the support and the permits granted to complete a research stay. To the Secretariat of Public Education-Higher Learning Vice Principal's Office for the postdoctoral PRODEP scholarship (agreement OF-19-13180) granted to R.G.-E. To the community of Peña Negra, San Sebastián Nopalera for the permits granted to carry out this study.

permite inicialmente el diseño del manejo integrado de ésta. Ambas enfermedades están causando una severidad del 50% en cada cultivo. La dispersión y emergencia de fitopatógenos en nuevas regiones en las que no se tenía reporte de su presencia, representa un compromiso para explorarlos y a partir de su identificación, establecer planes de control fitosanitario que contribuyan al manejo integrado del cultivo. Este trabajo representa una línea base para realizar estudios más profundos de los hongos que limitan la producción de alimentos en pequeñas comunidades del país. Por lo que es importante ampliar el muestreo a otras parcelas de la misma región, así como la revisión microscópica de más aislados fúngicos, a los cuales se les realizará el análisis de los genes que codifican para el factor de elongación 1- $\alpha$  (TEF 1- $\alpha$ ) y  $\beta$ -Tubulina ( $\beta$ -Tub).

De acuerdo con los postulados de Koch y a la identificación molecular, *Diaporthe* sp. se asoció como patógeno foliar de cuajinicuil en la localidad de Peña Negra, San Sebastián Nopalera, Oaxaca. Por otra parte, en síntomas foliares en guanábana se identificó *Lasiodiplodia* sp. en la misma localidad de Oaxaca, donde estos cultivos son de traspatio.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico del Valle de Etna y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua por el apoyo y los permisos otorgados para realizar una estancia de investigación. A la Secretaría de Educación Pública-Subdirección de Enseñanza Superior por la beca posdoctoral PRODEP (convenio OF-19-13180) otorgada a R.G.-E. A la comunidad de Peña Negra, San Sebastián Nopalera por los permisos otorgados para llevar a cabo este estudio.

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

## LITERATURE CITED

- Camero-Ayón C, Luna-Esquivel G, Rios-Velasco C, Díaz-Heredia M, Rodríguez-Palomera M, Betancourt-Aranguré A and Cambero-Campos O. 2019. Causal agents of rot in soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6:1-13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e538>
- Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ and Crous PW. 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 31(1):1-41. <https://doi.org/10.3767/003158513X666844>
- Guarnaccia V and Crous PW. 2018. Species of *Diaporthe* on Camellia and Citrus in the Azores Islands. *Phytopathologia Mediterranea* [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-23254](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-23254)
- Guo YS, Crous PW, Bai Q, Fu M, Yang MM, Wang XH, Du YM, Hong N, Xu WX and Wang GP. 2020. High diversity of *Diaporthe* species associated with pear shoot canker in China. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 45(1):132-162. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.45.05>
- Lutchmeah RS. 1988. *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of *Annona muricata* in Mauritius. *Plant Pathology* 37:152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02208.x>
- Mehl J, Wingfield MJ, Roux J and Slippers B. 2017. Invasive everywhere? Phylogeographic analysis of the globally distributed tree pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. *Forests* 8(5): 145. <https://doi.org/10.3390/f8050145>
- Mondal SN, Vincent A, Reis RF and Timmer LW. 2007. Saprophytic colonization of citrus twigs by *Diaporthe citri* and factors affecting pycnidial production and conidial survival. *Plant Disease* 91:387-392. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-4-0387>
- Picos-Muñoz PA, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A and Allende-Molar R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:54-74. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100054](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054)
- Sakalidis ML, Hardy GESJ and Burgess TI. 2011. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: A focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology* 4:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.06.001>
- Salvatore MM, Andolfi A and Nicoletti R. 2020. The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture* 10(10):488. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100488>
- Shahbaz M, Iqbal Z, Sallem A and Anjum MA. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). *Pakistan Journal of Botany* 41:359-368. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(1\)/PJB41\(1\)359.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(1)/PJB41(1)359.pdf)
- Slippers B and Wingfield MJ. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21:90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Sun W, Huang S, Xia J, Zhang X and Li Z. 2021. Morphological and molecular identification of *Diaporthe* species in south-western China, with description of eight new species. *MycKeys* 77:65-95. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.77.59852>
- Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Perales-Rosas D, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández E, Hernández-Arenas M, Ariza-Flores R and Gijón-Hernández AR. 2019. Distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa en Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37:464-478. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-7>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (Eds): *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego (USA)

# First occurrence of *Dasheen mosaic virus* (DsMV) in *Xanthosoma riedelianum* (Mangarito) in Brazil

## Primera ocurrencia del *Dasheen mosaic virus* (DsMV) en *Xanthosoma riedelianum* (Mangarito) en Brasil

**Addolorata Colariccio\***, Alyne de Fátima Ramos, Alexandre Levi Rodrigues Chaves, Ligia Maria Lembo Duarte, Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CP. 04014-002, S. Paulo, Brazil; **Ricardo Harakava**, ULR Biologia Molecular Aplicada, CPDSV, Instituto Biológico; **Joaquim Adelino Azevedo Filho**, APTA, Polo Leste Paulista, Monte Alegre do Sul, SP, Brazil; **Elliot W. Kitajima**, Universidade de São Paulo/ESALQ – Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Av. Pádua Dias, 11 – 13418-90 – Piracicaba, SP, Brasil

\*Corresponding autor: addolorata.colariccio@sp.gov.br

Received: March 18, 2023.

Accepted: April 21, 2023.

Colariccio A, Ramos AdeF, Rodrigues CAL, Lembo DLM, Harakava R, Azevedo FJA and Kitajima EW. 2023. First occurrence of *Dasheen mosaic virus* (DsMV) in *Xanthosoma riedelianum* (Mangarito) in Brazil. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 310-318.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2303-3>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

**Abstract.** *Xanthosoma riedelianum*, also called “mangarito” in Brazil, is an unconventional food plant (UFP) of the Araceae family native to tropical America. Foliar samples of the *X. riedelianum* showing mosaic, mottle and vein clearing symptoms were collected in the municipality of Monte Alegre (São Paulo State). Transmission electron microscope observations, mechanical transmission

**Resumen.** El *Xanthosoma riedelianum*, también llamado “mangarito” en Brasil, es una planta alimenticia no convencional (PANC) de la familia Araceae, nativa de América tropical. Se tomaron muestras de hojas de *X. riedelianum* con síntomas de mosaico, moteado y aclaramiento de venas en el municipio de Monte Alegre (Estado de São Paulo). Se realizó observaciones bajo un microscopio electrónico de transmisión, transmisión mecánica a plantas indicadoras, análisis serológicos (DAS-ELISA) y de RT-PCR indicando que los síntomas podrían estar relacionados con la presencia del virus de mosaico dasheen (DsMV, *Potyvirus*). Este es el primer reporte de DsMV en *X. riedelianum* en Brasil.

**Palabras clave:** Etiología, *Potyviridae*, aráceas.

to experimental plants, serological (DAS-ELISA) and RT-PCR analyzes indicated that the symptoms could be associated with the presence of dasheen mosaic virus (DsMV, *Potyvirus*). This is the first report of DsMV in *X. riedelianum* in Brazil.

**Keywords:** Etiology, *Potyviridae*, aroid.

*Xanthosoma riedelianum* is known by several common names as cocoyam, malanga (USA), yautia, tannia (Caribbean regions), tiquisque or malangay (Central America countries) and tayaó, mangará, mangareto or mangarito in Brazil (Giacometi and León, 1994; Kinupp and Lorenzi, 2021). So far, there is no consensus on the exact origin of the *X. riedelianum*, but records of its occurrence extend from Mexico to Brazil (Madeira *et al.*, 2015). Plants of *X. riedelianum* were domesticated during pre-Columbian period and consumed by the indians of the Tupi Guarani ethnic group long before the occupation of the New World (Azevedo-Filho, 2012). According to Souza *et al.* (2018), this plant is an important in the group of the tropical unconventional food plants (UFPs) belonging to Araceae family and, in the world, 0.362 million tons of your tubers are produced mainly in Cuba, Venezuela, El Salvador, Peru, and Dominican Republic.

One of the advantages of *X. riedelianum* cultivation is that its leaves can be used in human food, unlike others *Xanthosoma* species, which only rhizomes are edible (Madeira *et al.*, 2015). Among Araceae, the genera *Colocasia* and *Xanthosoma* are the UFPs species most used for human consumption and viruses are among the most economically important pathogens of these crops, resulting in significant yield losses (Kidanemariam, *et al.*, 2022). Dasheen mosaic virus (*Dasheen mosaic virus*-DsMV, *Potyvirus*)

A *Xanthosoma riedelianum* se le conoce por varios nombres comunes, tales como cocoyam, malanga (EE.UU.), yautia, tannia (regiones caribeñas), tiquisque o malangay (países centroamericanos) y tayaó, mangará, mangareto o mangarito en Brasil (Giacometi y León, 1994; Kinupp y Lorenzi, 2021). Hasta ahora no hay un consenso acerca del origen exacto del *X. riedelianum*, aunque los registros de su ocurrencia se extienden de México hasta Brasil (Madeira *et al.*, 2015). Las plantas de *X. riedelianum* se domesticaron en épocas precomombinas y las consumían los indígenas del grupo étnico Tupí Guaraní mucho antes de la ocupación del Nuevo Mundo (Azevedo-Filho, 2012). De acuerdo con Souza *et al.* (2018), esta planta es importante en el grupo de las plantas alimenticias no convencionales (PANC), pertenecientes a la familia Araceae y, en el mundo, 0.362 millones de toneladas de sus tubérculos se producen principalmente en Cuba, Venezuela, El Salvador, Perú y la República Dominicana.

Una de las ventajas del cultivo de *X. riedelianum* es que sus hojas pueden ser usadas para la alimentación humana, a diferencia de otras especies de *Xanthosoma*, de las cuales solo sus rizomas son comestibles (Madeira *et al.*, 2015). Entre las Araceae, los géneros *Colocasia* y *Xanthosoma* son las especies de PANC más usadas para el consumo humano y los virus son algunos de los patógenos más económicamente importantes de estos cultivos, ya que resultan en pérdidas significativas de rendimiento (Kidanemariam, *et al.*, 2022). El virus de mosaico dasheen (*Dasheen mosaic virus*-DsMV, *Potyvirus*) es el virus más importante que infecta a la familia de Araceae y ha sido reportado en todo el mundo en especies salvajes, ornamentales y de PANC (Yusop *et al.*, 2019; Varela-Benavides y Montero-Carmona, 2017). En los géneros *Alocasia*, *Colocasia* y *Xanthosoma*, la ocurrencia de DsMV ha sido reportada con frecuencia (Kidane-

is the most important virus that infects *Araceae* Family and it is reported throughout the world in wild, ornamental and UFPs species (Yusop *et al.*, 2019; Varela-Benavides and Montero-Carmona, 2017). In *Alocasia*, *Colocasia* and *Xanthosoma* genera, the DsMV occurrence is frequently been reported (Kidanimariam *et al.*, 2022). However, a DsMV strain that exclusively infects *Vanilla* spp. has also been described (Wang *et al.*, 2017). DsMV is spread by vegetative propagation, transmitted non-persistently by aphids of the genus *Aphis* and *Myzus* (Zettler and Hartman, 1987; Elliot *et al.*, 1997). The first report of DsMV was done in corms of *Zantedeschia elliottina* (golden calla lily) imported into the United States of America from the Netherlands (Zettler *et al.*, 1970). The natural DsMV detection, in Central America, was reported in *Colocasia esculenta* (eddo or dasheen) and *Xanthosoma* spp. in Puerto Rico, Venezuela, Trinidad, Solomon Islands and Costa Rica (Ramirez, 1985). In Brazil, DsMV had been reported in UFPs species, like *Colocasia esculenta* (taro) and *Amorphophallus konjac* (voodoo lily) (Rodrigues *et al.*, 1984; Chagas *et al.*, 1993) and also in some ornamental species, as *Alocasia macrorhiza* (giant taro), *Xanthosoma atrovirens* (mouse-cup taro), *Dieffenbachia amoena* (dumb cane) and others (Rodrigues *et al.*, 1984; Rivas *et al.*, 2003; Varela-Benavides and Montero-Carmona, 2017). DsMV causes severe damage in different aroid species, which can be attenuated by meristem culture (Chen *et al.*, 2001; Valverde, *et al.*, 1997). Therefore, the objective was to identify the virus associated with viral diseases in *X. riedelianum* plants in Brazil.

Three samples of *X. riedelianum* plants (isolates M5, M7 and M8) from an experimental field located in the municipality of Monte Alegre do Sul (São Paulo State), showing foliar symptoms of mosaic, feathery mottle and vein clearing patterns (Figures 1A, 1B) were collected to identify the virus.

mariam *et al.*, 2022). Sin embargo, también se ha descrito una cepa de DsMV que infecta exclusivamente a *Vanilla* spp. (Wang *et al.*, 2017). El DsMV es esparcido por propagación vegetativa y transmitida de forma no persistente por pulgones de los géneros *Aphis* y *Myzus* (Zettler y Hartman, 1987; Elliot *et al.*, 1997). El primer reporte de DsMV se realizó en bulbos de *Zantedeschia elliottina* (alcatrazes amarillos) importados a Estados Unidos desde los Países Bajos (Zettler *et al.*, 1970). La detección natural de DsMV en Centroamérica se reportó en *Colocasia esculenta* (eddo) y *Xanthosoma* spp. en Puerto Rico, Venezuela, Trinidad, las Islas Salomón y Costa Rica (Ramirez, 1985). En Brasil, el DsMV había sido reportado en especies de PANCs, tales como *Colocasia esculenta* (taro) y *Amorphophallus konjac* (konjac) (Rodrigues *et al.*, 1984; Chagas *et al.*, 1993), así como en algunas especies ornamentales, como *Alocasia macrorhiza* (taro gigante), *Xanthosoma atrovirens* (quequesque), *Dieffenbachia amoena* (amoena) y otras (Rodrigues *et al.*, 1984; Rivas *et al.*, 2003; Varela-Benavides y Montero-Carmona, 2017). DsMV causa daños severos en diferentes especies de aráceas, que pueden ser atenuadas por cultivos por meristemas (Chen *et al.*, 2001; Valverde, *et al.*, 1997). Por lo anterior el objetivo fue identificar el virus asociado a enfermedades tipo viral en plantas de *X. riedelianum* en Brasil.

Para identificar el virus, se recolectaron tres muestras de plantas de *X. riedelianum* (aislamientos M5, M7 y M8) de un campo experimental ubicado en el municipio de Monte Alegre do Sul (estado de São Paulo), y que presentaba síntomas foliares de mosaico, moteado plumoso y patrones de aclaramiento de venas (Figures 1A, 1B). Muestras sintomáticas y asintomáticas de hojas fueron sujetas a observaciones bajo un microscopio electrónico de transmisión (MET), transmisión mecánica a plantas indicadoras, una prueba serológica

Symptomatic and asymptomatic leaf samples were submitted to transmission electron microscope (TEM) observations, mechanical transmission to experimental plants, serological test (DAS-ELISA) with potyvirus group antiserum (AGDIA®), total RNA extraction and RT-PCR performed with primers set designed to anneal to the cylindrical inclusion (CI) genomic regions of *Potyvirus* according to Ha *et al.* (2008).

The products amplified by RT-PCR were eluted from the agarose gel, using the “Concert Rapid Gel Extraction System” (Life Technologies) and were linked in pGEM-T vector (Promega) and used for the transformation of competent cells of *Escherichia coli* (DH5- $\alpha$ ) and sequenced by the chain termination reaction technique, using the ABI 377 automatic sequencer and the “ABI kit PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Ampli Taq DNA Polymerase” (Perkin Elmer). The sequence alignments obtained in both directions were done with the aid of the program Sequencer 3.1 (Gene Codes Corporation) and comparisons, with the existing sequences in GenBank, were made through of the “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) program from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. The identity percentage at the nucleotide level among sequences was determined by PAUP v. 4.0b10 for Macintosh. The likelihood ratio test (LRT) for the nucleotide substitution models comparison was performed using Modeltest v. 3.06 (Posada and Crandall, 2001). The tree reconstruction was also performed under maximum likelihood (ML) criterion using PAUP.

Symptomatic plants were negative in host plants, positive to *Potyvirus* in DAS-ELISA and in leaf ultrathin sections observed at TEM revealed the presence of cylindrical inclusions (CI), pinwheels and laminar aggregates characteristics of

(DAS-ELISA) con antisuero del grupo del potyvirus (AGDIA®), extracción de ARN y RT-PCR realizado con un conjunto de iniciadores diseñados para aparear a las regiones genómicas de la inclusión cilíndrica (IC) del *Potyvirus* según Ha *et al.* (2008).

Los productos amplificados por RT-PCR fueron visualizados en gel de agarosa, usando el Concert Rapid Gel Extraction System (Life Technologies) y fueron vinculados en un vector pGEM-T (Promega) y usados para la transformación de células competentes de *Escherichia coli* (DH5- $\alpha$ ) y se secuenciaron por la técnica de reacción de terminación de cadena, utilizando el secuenciador automático ABI 377 y el “ABI kit PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Ampli Taq DNA Polymerase” (Perkin Elmer). Los alineamientos de secuencia obtenidos en ambas direcciones fueron realizados con la ayuda del programa Sequencer 3.1 (Gene Codes Corporation) y las comparaciones con las secuencias existentes en GenBank, fueron realizadas a través del programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. El porcentaje de identidad a nivel de nucleótido entre secuencias se determinó por PAUP v. 4.0b10 para Macintosh. La prueba de razón de verosimilitud para la comparación de modelos de sustitución de nucleótidos se realizó usando Modeltest v. 3.06 (Posada y Crandall, 2001). La reconstrucción del árbol también se realizó bajo criterios de máxima verosimilitud usando PAUP.

Las plantas sintomáticas fueron negativas en plantas hospedantes, positivas a *Potyvirus* en DAS-ELISA y en secciones ultradelgadas observadas en TEM revelaron la presencia de inclusiones cilíndricas (IC), molinillos y agregados laminares característicos del potyvirus en el citoplasma de células infectadas (Figura 1C). RT-PCR de muestras de hojas

potyvirus in cytoplasm of infected cells (Figure 1C). RT-PCR from symptomatic and asymptomatic leaf samples amplified an expected band size of 700 bp (Ha *et al.*, 2008). After sequencing, three sequences with 480, 633 and 684 bp were obtained from M5, M7 and M8 isolates, respectively. Sequences showed greater identity with DsMV isolates by the BLAST tool and were available on GenBank (M5: OQ408279; M7: OQ408280; M8: OQ 408281). After alignment and analyzes, the greatest identities were observed between Brazilian DsMV isolates (M5, M7 and M8) and others from different hosts and regions of the world (Table 1).

sintomáticas y asintomáticas amplificaron un tamaño de banda esperado de 700 bp (Ha *et al.*, 2008). Después de la secuenciación, tres secuencias con 480, 633 y 684 bp se obtuvieron de aislamientos de M5, M7 y M8, respectivamente. Las secuencias presentaron una mayor identidad con aislamientos de DsMV por medio de la herramienta BLAST y se hicieron disponibles en GenBank (M5: OQ408279; M7: OQ408280; M8: OQ408281). Después del alineamiento y análisis, las mayores identidades observadas fueron entre aislamientos de DsMV brasileños (M5, M7 y M8) y otros de diferentes hospedantes y regiones del mundo (Cuadro 1). Es

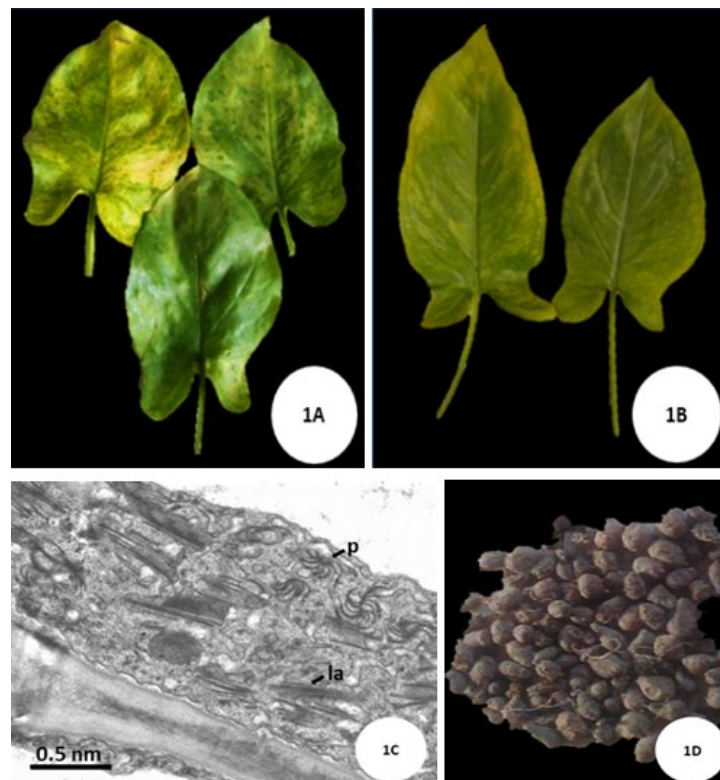


Figure 1. A) Leaves of *X. riedelianum* showing symptoms of mosaic and yellowing. B) Leaves of *X. riedelianum* showing vein clearing patterns symptoms. C) Photomicrograph of the leaf parenchyma cell of *X. riedelianum*, naturally infected by the dasheen mosaic virus (DsMV), an ultrathin section of the cell cytoplasm showing lamellar inclusions “la” and pinwheels “p”, characteristic of *Potyvirus*. D) Rhizomes of *X. riedelianum* used as subsistence foods.

Figura 1. A) Hojas de *X. riedelianum* con síntomas de mosaico y amarillamiento. B) Hojas de *X. riedelianum* con síntomas de patrones de aclaramiento de venas. C) Microfotografía de la célula de parénquima de la hoja de *X. riedelianum*, infectada de forma natural por el virus del mosaico de dasheen (DsMV), una sección ultradelgada del citoplasma celular presentando las inclusiones laminares “la” y forma de molinillos “p”, característicos del *Potyvirus*. D) Rizomas de *X. riedelianum* usados como alimentos de subsistencia.



**Table 1. Identity among nucleotide sequences corresponding to the cylindrical inclusion region of dasheen mosaic virus (DsMV) isolated from Brazilian *Xanthosoma riedelianum* (M5, M7 and M8), compared with other DsMV isolates from different hosts and regions of the world.**

**Cuadro 1. Identidad entre secuencias de nucleótido correspondientes a la región de inclusión cilíndrica del virus de mosaico dasheen (DsMV) aislado del *Xanthosoma riedelianum* brasileño (M5, M7 y M8), comparado con otros aislamientos de DsMV de diferentes hospedantes y regiones del mundo.**

| DsMV isolates – Host – Country                          | Identity (%) |             |             |
|---------------------------------------------------------|--------------|-------------|-------------|
|                                                         | M5           | M7          | M8          |
| <b>M5</b>                                               | –            | 74.4        | 72.1        |
| <b>M7</b>                                               | –            | –           | <b>81.0</b> |
| <b>M8</b>                                               | –            | –           | –           |
| MG602234* – <i>Xanthosoma</i> sp. – Australia           | 72.0         | 80.0        | <b>84.6</b> |
| JX083210 – <i>Pinellia pedatissecta</i> – China         | 72.2         | <b>91.2</b> | 78.7        |
| KT026108 – <i>Colocasia esculenta</i> – India           | 72.2         | 87.7        | 79.8        |
| AJ298033 – <i>Zantedeschia aethiopica</i> – China       | 73.3         | 87.3        | 78.3        |
| MW651851 – <i>C. esculenta</i> – Vietnam                | 76.0         | 84.4        | 78.9        |
| MT790349 – <i>C. esculenta</i> – Fiji                   | 73.7         | 84.2        | 79.8        |
| MT790352 – <i>C. esculenta</i> – Fiji                   | 72.5         | 82.5        | 78.9        |
| MT790351 – <i>C. esculenta</i> – Fiji                   | 72.5         | 82.5        | 78.9        |
| ON086743 – <i>C. esculenta</i> – Papua New Guinea       | 74.8         | 82.3        | 78.3        |
| KY242358 – <i>C. esculenta</i> – USA                    | 74.8         | 81.2        | 78.3        |
| LC723667 – <i>Zantedeschia aethiopica</i> – South Korea | <b>76.5</b>  | 85.4        | 78.7        |
| MZ043618 – <i>Typhonium giganteum</i> – China           | 73.7         | 83.3        | 78.3        |
| KJ786965 – <i>Amorphophallus paeoniifolius</i> – China  | 73.7         | 83.1        | 77.1        |
| KX505964 – <i>Vanilla tahitensis</i> – Cook Islands     | 73.3         | 82.3        | 75.8        |

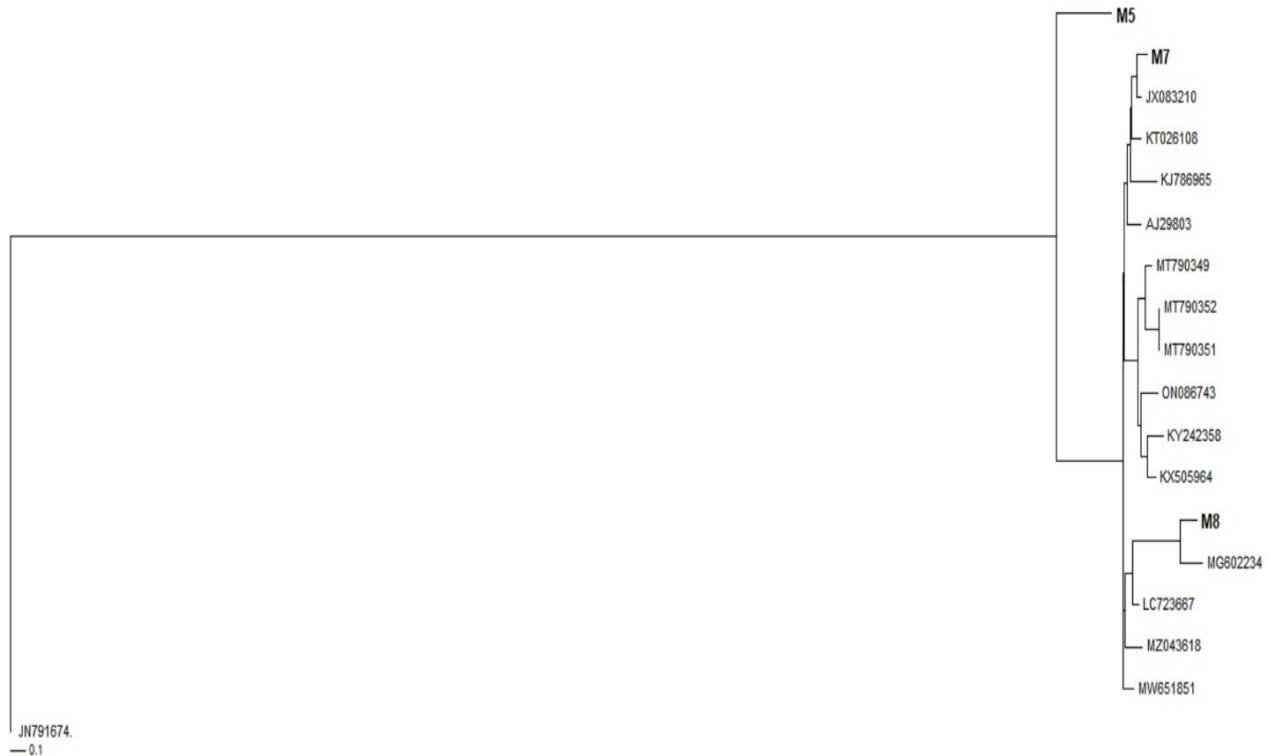
\* GenBank accession number, bold numbers correspond to the highest identity. / † Número de acceso de GenBank, números en negritas corresponden a la identidad más alta.

It is important to mention that there is no genome sequence of Brazilian or Latin American isolates of DsMV available in GenBank.

The phylogenetic analyzes as well as the tree topology reconstructed under ML methodology indicated that the M7 isolate formed a sister group with the DsMV isolate from *Pedatissected pinellia* from China (Figure 2). In addition, the M8 isolate shared a common ancestor with the DsMV isolated from *Xanthosoma* sp. from Australia, corroborating the analysis of identity percentage. However, M5 occupied a more basal position in the topology of the phylogenetic tree, in addition to having shared the lowest percentage of identities, indicating that it is a different DsMV isolate (Table 1, Figure 2).

importante mencionar que no hay secuencias genómicas de aislados brasileños o latinoamericanos de DsMV disponibles en GenBank.

Los análisis filogenéticos y la topología del árbol reconstruido bajo la metodología de ML indicaron que el aislamiento M7 formó un grupo hermano con el aislado de DsMV de *Pedatissected pinellia* de China (Figura 2). Además, el aislamiento M8 compartía un ancestro común con el aislamiento de DsMV aislado de *Xanthosoma* sp. de Australia, lo cual corrobora el análisis del porcentaje de identidad. Sin embargo, M5 ocupó una posición más basal en la topología del árbol filogenético, además de compartir el menor porcentaje de identidades, indicando que es un aislamiento diferente de DsMV (Cuadro 1, Figura 2).



**Figure 2.** Maximum likelihood phylogram of cylindrical inclusion partial sequences of dasheen mosaic virus (DsMV) isolated from Brazilian *Xanthosoma riedelianum* (M5, M7 and M8) and other DsMV isolates from different hosts and regions of the world represented by GenBank accession number. Banana bract mosaic virus sequence (JN791674) was used as outgroup. The tree was constructed using the HKY + G nucleotide substitution model (G= 0.2029).

**Figura 2.** Filograma de máxima verosimilitud de secuencias parciales de inclusión cilíndrica del virus del mosaico dasheen (DsMV) aislado del *Xanthosoma riedelianum* brasileño (M5, M7 y M8) y otros aislados de DsMV de diferentes hospedantes y regiones del mundo, representado por el número de accesoión de GenBank. La secuencia del virus de mosaico de las brácteas del plátano (JN791674) fue usado como un grupo marginal. El árbol fue creado usando el modelo de sustitución de nucleótidos HKY + G (G= 0.2029).

Although there are reports of the occurrence of DsMV in ornamental species of *Xanthosoma*, like *X. atrovirens* and *X. sagitifolium* (Rodrigues *et al.*, 1984; Varela-Benavides and Montero-Carmona, 2017), until now this is the first occurrence the natural infection of *X. riedelianum* by DsMV in Brazil.

Studies on the occurrence of viruses in this plant species that is important, because its tubers (Figure 1D) are used in human food, as well as yam, taro, among others, which are a source of calories for

Aunque hay reportes de la ocurrencia de DsMV en especies ornamentales de *Xanthosoma*, tales como *X. atrovirens* y *X. sagitifolium* (Rodrigues *et al.*, 1984; Varela-Benavides y Montero-Carmona, 2017), hasta ahora, esta es la primera ocurrencia de la infección natural de *X. riedelianum* por DsMV en Brasil.

Es importante estudiar la ocurrencia de virus en esta especie vegetal, ya que sus tubérculos (Figura 1D) son usados para la alimentación humana, así como el camote, taro y otros, que son fuentes de

people in situation of nutritional vulnerability and also a source of income for small farmers (Varela-Benavides and Montero-Carmona, 2017).

*X. riedelianum* is among numerous rustic plants found in tropical regions whose the majority of these species are starchy, classified as caloric and considered subsistence foods. Despite being a great source of carbohydrates, low productivity drove farmers away from its cultivation, due to the irregular size of the rhizomes and the low volume of production without commercial value (Madeira *et al.*, 2015). Although, these plants have great economic importance worldwide since they are a source of calories for low-income people and of earnings for small farmers, few studies have been done with these unconventional foods (Varela-Benavides and Montero-Carmona, 2017).

The positive results of the DAS-ELISA, against universal antiserum potyvirus group and presence of cylindrical inclusion in the electron microscopy and the result of the RT-PCR, with the primers for CI followed by sequencing were decisive for the identification of the DsMV in *X. riedelianum*. This is the first report of the DsMV in this species of UFPs.

## CITED LITERATURE

- Azevedo Filho, JA 2012. Mangarito “a batatinha brasileira”: produção em sistema orgânico. Pesquisa & Tecnologia 9 :1. <http://www.aptaregional.sp.gov.br/>
- Chagas CM, Colariccio A, Galletti SR and Kitajima EW. 1993. Natural infection of *Amorphophallus konjac* with dasheen mosaic virus in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 18: 551-554.
- Chen J, Chen J, Chen J and Adams MJ. 2001. Molecular characterisation of an isolate of *Dasheen mosaic virus* from *Zantedeschia aethiopica* in China and comparisons in the genus *Potyvirus*. *Archives of Virology* 146:1821-1829. <https://doi.org/10.1007/s007050170068>
- Elliott MS, Zettler, FW and Brown LG. 1997. Dasheen mosaic potyvirus of edible and ornamental aroids. University of Florida, Plant Pathology Circular no. 384. <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-44.pdf>

calorías para personas con vulnerabilidad nutricional, así como una fuente de ingresos para productores de pequeña escala (Varela-Benavides y Montero-Carmona, 2017).

*X. riedelianum* es entre las numerosas plantas rústicas halladas en regiones tropicales, y en el que la mayoría de estas especies contienen almidones, clasificadas como calóricas y considerados alimentos de subsistencia. A pesar de ser una gran fuente de hidratos de carbono, la baja productividad alejó a los productores de su producción, debido al tamaño irregular de los rizomas y el bajo volumen de producción sin valor comercial (Madeira *et al.*, 2015). Aunque estas plantas son de gran importancia mundial por ser una fuente de calorías para personas de bajos recursos y de ingresos para pequeños productores, son pocos los estudios realizados con estos alimentos no convencionales (Varela-Benavides y Montero-Carmona, 2017).

Los resultados positivos del DAS-ELISA contra el grupo de antisuero potyvirus universal y la presencia de la inclusión cilíndrica en la microscopía y el resultado del RT-PCR, con los iniciadores de IC seguidos de la secuenciación, fueron decisivos para la identificación del DsMV en *X. riedelianum*. Este es el primer reporte del DsMV en esta especie de PANC.

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

- Giacometti DC and Léon J. Tannia 1994. Yautia (*Xantossoma sagittifolium*). In: Neglected crops: 1492 from a different perspective (FAO Plant Production and Protection Series, no.26), ISBN 92-5-103217-3. <https://www.fao.org/3/t0646e/t0646e.pdf>
- Ha C, Revill P, Harding RM, Vu M and Dale JL. 2008. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Archives of Virology* 153:45-60. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1067-1>.

- Kinupp VF and Lorenzi HP. 2021. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas Second Edition. IPSIS Gráfica e Editora. Nova Odessa, São Paulo. 768p.
- Kidanemariam DB, Sukal AC, Abraham AD, Njuguna JN, Stomeo F, Dale JL, James AP and Harding RM. 2022. Incidence of RNA viruses infecting taro and tannia in East Africa and molecular characterisation of dasheen mosaic virus isolates. *Annals of Applied Biology* 180: 211–223. <https://doi.org/10.1111/aab.12725>.
- Madeira NR, Brotel N, Amaro GB and Melo RAC. 2015. Mangarito: sabor de tradição. *Horticultura Brasileira* 33:3. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000300023>.
- Posada D and Crandall KA. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50: 580–601.
- Ramirez P. 1985. Aislamiento y caracterización del virus del mosaico del “dasheen” (DMV) en Costa Rica. *Turrialba* 35: 279-283.
- Rivas EB, Galleti SR, Duarte LML, Alexandre MAV, Cilli A and Estelita MEM. 2003. Detecção de *Potyviridae* em espécies de *Dieffenbachia*, *Arquivos do Instituto Biológico* 70: 85-87.
- Rodrigues MGR, Kitajima EW, Lin MT. 1984. Infection of edible and ornamental araceous plants by dasheen mosaic virus in Brazil [*Colocasia esculenta*, taro, *Alocasia* so.]. *Fitopatologia Brasileira* 9: 291-299.
- Souza DC de, Silva LFL, Resende LV, Costa PA, Guerra TS, Gonçalves WM. 2018. Influence of irrigation, planting density and vegetative propagation on yield of rhizomes of arrowroot starch. *Revista de Ciências Agrárias* 41:683-691. <https://doi.org/10.19084/RCA18015>.
- Varela-Benavides I, Montero-Carmona W. 2017. Detección del virus del mosaico del tiquizque en aráceas comestibles mediante qPCR. *Tecnología en Marcha* 30:97-104. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v30i2.3201>.
- Valverde R, Gómez L, Saborío F, Torres S, Arias O, Thorpe T. 1997. Field evaluation of Dasheen Mosaic Virus-free cocoyam plants produced by in vitro techniques. *Scientia Horticulturae* 68: 37-47. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00984-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00984-3).
- Wang YN, Melzer MJ, Borth WB, Green JC, Hamim I, Hu JS. 2017. First Report of *Bean yellow mosaic virus* in Vanilla in Hawaii. *Plant Disease* 101: 1557-1557. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0091-PDN>
- Yusop MSM, Saad MFM, Talip N, Baharum SN, Bunawan H. 2019. A Review on Viruses Infecting Taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). *Pathogens* 8:56 <https://doi.org/10.3390/pathogens8020056>
- Zettler FW, Foxe MJ, Hartman RD, Edwardson JR, Christie RG. 1970. Filamentous virus infecting dasheen and other araceous plants. *Phytopathology* 60: 983-987. <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-983>.
- Zettler FW and Hartman RD. 1987. Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Disease* 71: 958-963. <https://doi.org/10.1094/PD-71-0958>.