

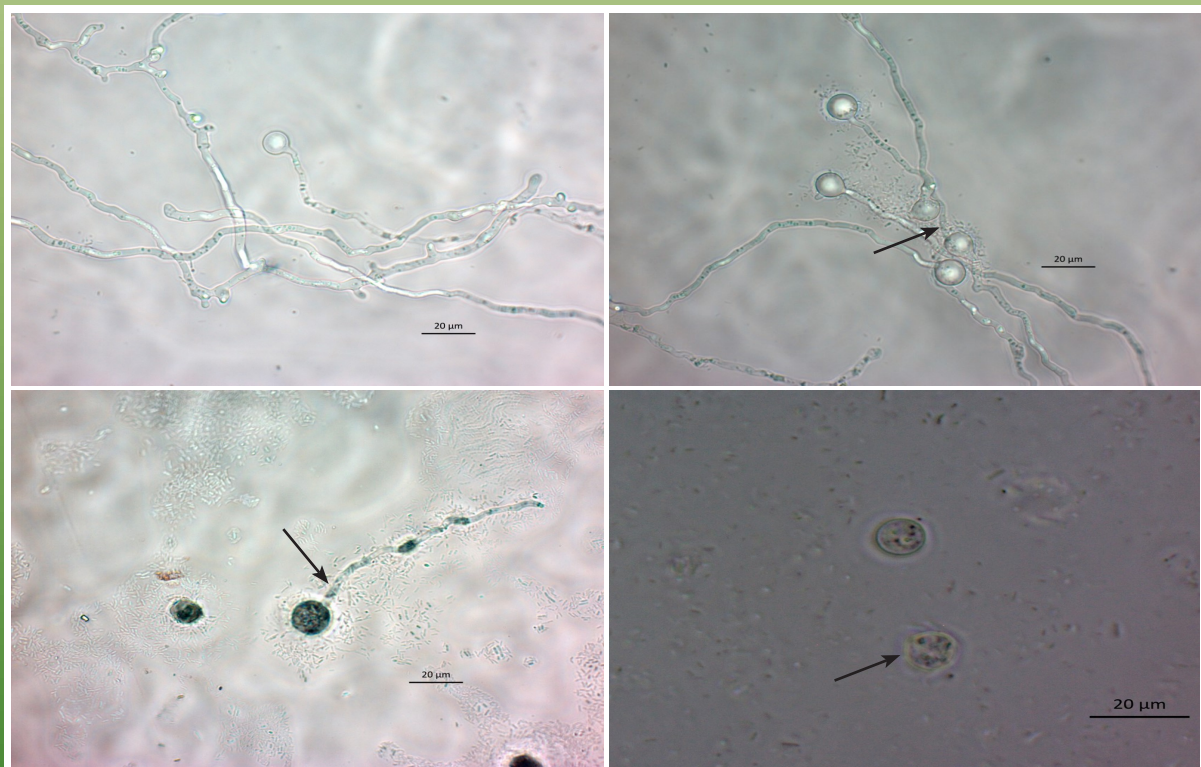
ISSN-2007-8080

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 36, NÚMERO 2, Mayo 2018



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

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados.

Editor Técnico * Technical Editor

Tec. Noemi De La Rosa Sánchez, RMF.

Composición Web * Web Composition

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, Colegio de Postgraduados.

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH.

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA.

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

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA.

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, UACH.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH.

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEM.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez, UASLP-CONACYT.

Dr. Hernán García Ruíz, UNL, USA.

Dr. Sami Jorge Micheref, UFRPE, BR.

Dra. Nadia Landero Valenzuela, UPFIM.

Dr. José Joaquín Velázquez Monreal, INIFAP.

Dr. Andrés Quezada Salinas, DGSV.

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH.

Portada: Zoospora de *Phytophthora capsici* germinada con y sin inoculación de *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. B, C y D, zoosporas afectadas por la actividad bacteriana.

Original: Raymundo Saúl García Estrada/Pág. 215-232.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

Response of ten yellow mango cultivars to powdery mildew (*Erysiphe quercicola*) damage in Mexico * Respuesta de diez cultivares de mango amarillo al daño por cenicilla (*Erysiphe quercicola*) en México. 196

Pérez-Rodríguez A, Mora-Aguilera JA, De León-García de Alba C, Sandoval-Islas JS, Hernández-Castro E, Vásquez-López A.

Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici* * Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*. 215

Ley-López N, Márquezera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS, Allende-Molar R.

Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico * Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México. 233

Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán LE, Meza-Moller AC.

Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani* * Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. 256

Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R, García-Hernández JL.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

Pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* in varieties and wheat lines grown in Paraguay * Patogenicidad de *Magnaporthe oryzae* en variedades y líneas de trigo cultivadas en Paraguay. 276

Chávez AR, Mohan-Kohli M.

Anatomic alterations and hyperplasia induced by *Euphorbia mosaic virus* Yucatan Peninsula isolate at the meshophyll * Alteraciones anatómicas e hiperplasia inducidas por *Euphorbia mosaic virus* aislamiento Yucatán Península en el mesófilo. 287

Gamboa-Tec N, Kú-González A, Gutiérrez-Pacheco LC, Castaño E, López-Ochoa L.

***Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* mating types A1 and A2 coexist in ornamental nursery plants** * Tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* coexisten en plantas ornamentales de vivero. 298

Soto-Plancarte A, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, López-Pérez L, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, Álvarez-Vargas JE.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

Organisms associated with damage to post-harvest potato tubers * Organismos asociados a daños en tubérculos de papa en postcosecha. 308

García-Ávila CJ, Valenzuela-Tirado GA, FlorencioAnastasio JG, Ruiz-Galván I, Moreno-Velázquez M, Hernández-Macías B, López-Buenfil JA, Bravo-Pérez D, Pineda-Ríos JM, Quezada-Salinas A, Ávila-Quezada G.

Leafhoppers that carry begomoviruses on roselle crop (*Hibiscus sabdariffa* L.) * Cicadélidos portadores de begomovirus en el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 321

Martínez-Cruz J, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J, Zamora-Macorra EJ, Ramírez-Rojas S.

Diagrammatic scale for quantification of rust severity in teak leaves * Escala diagramática para cuantificación de la severidad de la roya en hojas de teca. 331

Cristiane-Delmadi L, Cristiane de Pieri, Sander-Porcena A, Luiz-Furtado E.

First Report of *Colletotrichum* spp. in fruits of allspice (*Pimenta dioica*) in Veracruz, Mexico * Primer reporte del género *Colletotrichum* spp. en frutos de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) en Veracruz, México. 342

Velázquez-Silva A, García-Díaz SE, Robles-Yerena L, Nava-Díaz C, Nieto-Ángel D.

REPORTES FITOPATOLÓGICOS * PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS

First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico * Primer reporte de *Cladosporium cladosporioides* causando pudriciones en frutos de zapote mante en México. 356

Nabor-Romero O, Silva-Valenzuela M, Rojas-Martínez RI, Garza-García R.

Response of ten yellow mango cultivars to powdery mildew (*Erysiphe quercicola*) damage in Mexico

Respuesta de diez cultivares de mango amarillo al daño por cenicilla (*Erysiphe quercicola*) en México

Amado Pérez-Rodríguez, José Antonio Mora-Aguilera*, Carlos De León-García de Alba, José Sergio Sandoval-Islas, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; Elías Hernández-Castro, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, Carretera Iguala-Tuxpan km 2.5, CP. 40101, Iguala, Guerrero, México; Alfonso Vásquez-López, Laboratorio de Fitopatología, Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR, Calle Hornos 1003, Colonia Noche Buena, Municipio Santa Cruz Xoxocotlán, CP. 71230, Oaxaca, Oaxaca, México. *Autor para correspondencia: aguilera@colpos.mx.

Recibido: 30 de Noviembre, 2017. Aceptado: 28 de Enero, 2018.

Pérez-Rodríguez A, Mora-Aguilera JA, De León-García de Alba C, Sandoval-Islas JS, Hernández-Castro E, Vásquez-López A. 2018. Response of ten yellow mango cultivars to powdery mildew (*Erysiphe quercicola*) damage in México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 196-214.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-5

Primera publicación DOI: 06 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 06, 2018.

Resumen. La cenicilla del mango (*Erysiphe quercicola*) causa pérdidas de producción de hasta 90%, por lo que es necesario estimar la tolerancia a este patógeno en el nuevo germoplasma introducido o generado recientemente para incrementar el potencial de exportación de México. El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta al daño por cenicilla mediante una técnica de inoculación optimizada para inducir la enfermedad en hojas adheridas de

Abstract. Mango powdery mildew (*Erysiphe quercicola*) causes up to 90% production losses, so it is necessary to estimate the tolerance to this pathogen of the new germplasm introduced or recently generated to increase the export potential of Mexico. The objective of this study was to determine the response to powdery mildew damage by means of an optimized inoculation technique to induce the disease in attached leaves of 10 new yellow mango cultivars for Mexico. Two inoculation methods were evaluated. The best was to spray conidia at 4.6×10^5 spores mL^{-1} on the adaxial and abaxial leaves surfaces, at \pm 300-450 lux and suspended in polysorbate 20 + surfactant based on ethoxilate alcohols at 2%. The inoculation test showed that the cv. Alphonso was moderately tolerant and Neelum and Fairchild were slightly tolerant. In contrast, Nam Doc Mai, Rosigold, Ataulfo Zafiro, Cotaxtla and Kesar were susceptible and Mallika and Ivory were highly susceptible. The most tolerant cultivars had lower

10 cultivares de mango amarillo nuevos para México. Se evaluaron dos métodos de inoculación. El mejor fue por aspersión de conidios a una concentración de 4.6×10^5 esporas mL⁻¹, en las superficies adaxial y abaxial de las hojas, a $\pm 300 - 450$ lux y suspendidos en polisorbato 20 + surfactante a base de alcoholes etoxilados al 2%. La prueba de inoculación mostró que el cv. Alphonso fue moderadamente tolerante y Neelum y Fairchild ligeramente tolerantes. En contraste, Nam Doc Mai, Rosigold, Ataúlfo Zafiro, Cotaxtla y Kesar fueron susceptibles y Mallika e Ivory altamente susceptibles. Los cultivares más tolerantes presentaron valores menores de incidencia, severidad máxima, área bajo la curva del progreso de la enfermedad, tasa de infección aparente y densidad de conidios por cm² de área foliar dañada.

Palabras clave: hojas, susceptibilidad, germoplasma, severidad.

México representa el séptimo país productor de mango (*Mangifera indica* L.) con un volumen anual superior a 1.8 Mt y es el principal exportador con el 24% del volumen exportado global (FAO, 2016). Entre 1992 y 2006 México perdió competitividad en aproximadamente 27.6% en la exportación de mango a EE.UU., debido al incremento de la participación comercial de India, Tailandia, Perú, Brasil y Ecuador (Hernández y Martínez, 2009). Este problema creciente está asociado a la oferta limitada de mango amarillo en el mercado internacional, ya que México comercializa únicamente frutos del cv. Ataúlfo y este presenta baja productividad debido principalmente a presencia de enfermedades, frutos partenocárpicos, mezclas genéticas y marcada estacionalidad y alternancia de cosecha (Villegas y Mora, 2011). Para mitigar estas limitantes, el Colegio de Postgraduados introdujo

values of incidence, maximum severity, area under the disease progress curve, apparent infection rate and conidia density per cm² of damaged leaf area (LSD, $P \leq 0.05$).

Key words: leaves, susceptibility, germplasm, severity.

Mexico is the seventh largest mango (*Mangifera indica* L.) producing country in the world, with an annual volume of more than 1.8 Mt, and is the main exporter, accounting for 24% of global mango exports (FAO, 2016). Between 1992 and 2006, Mexico lost approximately 27.6% of its competitiveness as a mango exporter to the United States due to the increased commercial share of India, Thailand, Peru, Brazil and Ecuador (Hernández and Martínez, 2009). This growing problem is associated with the limited supply of yellow mangoes on the international market, since Mexico trades only Ataulfo cv. fruits, whose productivity is low mainly due to diseases, parthenocarpic fruits, genetic mixtures, as well as marked seasonality and alternate bearing (Villegas and Mora, 2011). To mitigate such limitations, in 2011 and 2012, the Colegio de Postgraduados introduced eight new yellow mango cultivars from Florida, USA, that have export potential. Also, the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) registered two new local cultivars of the Ataulfo clone in 2009 (A. Diamante) and 2012 (A. Zafiro).

Mango powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* (anamorph: *Pseudoidium anacardii*) (Braun and Cook, 2012; Félix *et al.*, 2013; Tam, 2017) is one of the most important diseases that affects mango because of its high level of severity, endemism and cosmopolitan distribution (Raheel *et al.*, 2008) that cause 80-90% of the mango

en 2011 y 2012 ocho nuevos cultivares de mango amarillo con potencial de exportación procedentes de Florida, EE.UU. Además, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) registró dos nuevos cultivares locales del clon Ataúlfo en 2009 (A. Diamante) y 2012 (A. Zafiro).

La cenicilla del mango, causada por *Erysiphe quercicola* (anamorfo: *Pseudoidium anacardii*) (Braun y Cook, 2012; Félix *et al.*, 2013; Tam, 2017) es una de las enfermedades más importantes de este frutal por su alta severidad, endemismo, distribución cosmopolita (Raheel *et al.*, 2008) y causar pérdidas de cosecha de 80-90% (Gupta, 1989b; Shoeman *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 2014). En entidades federativas exportadoras de mango como Michoacán puede afectar el 60% de los árboles comerciales, representando 30-50 mil ton de fruta (Arias *et al.*, 2004) y en Sinaloa ocasionar pérdidas de 70% durante floración (Félix *et al.*, 2017). El hongo ataca hojas, inflorescencias y frutos juveniles. El tejido infectado se cubre con un polvo blanco debido al crecimiento micelial y esporulación. Las lesiones iniciales en follaje son de coloración rojiza, el daño avanzado causa deformación de lámina foliar con esporulación abundante, necrosis y defoliación severa. En tejido reproductivo induce caída de flores, necrosis extensiva de inflorescencias y aborto de frutos pequeños (Sinha *et al.*, 2001; 2002; Nasir *et al.*, 2014).

La relevancia de la infección foliar en la recurrencia y severidad de epidemias en inflorescencias está ampliamente documentada, ya que el hongo sobrevive como micelio en yemas y hojas de la estación de crecimiento o de años previos, cuando las condiciones ambientales a la infección son desfavorables o en ausencia de tejido reproductivo (Schoeman *et al.*, 1995; Misra, 2001; Nasir *et al.*, 2014). Cuando las flores aún están ausentes, la infección temprana en hojas juveniles perpetúa la

production losses (Gupta, 1989b; Shoeman *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 2014). In mango exporting states such as Michoacan, it may affect 60% of commercial trees, the equivalent of 30,000 to 50,000 tons of fruit (Arias *et al.*, 2004); in Sinaloa, the disease causes 70% losses during the flowering stage (Félix *et al.*, 2017). The fungus damages leaves, flowers and young fruits. The infected tissue is covered with white powder due to mycelial growth and sporulation. The first lesions on leaves are reddish in color, but at advanced stages, the fungus deforms the leaf lamina and produces abundant sporulation, necrosis and severe defoliation. In the reproductive tissue, it causes fall of flowers, extensive necrosis of inflorescences and abortion of young fruits (Sinha *et al.*, 2001; 2002; Nasir *et al.*, 2014).

The effect of foliar infections on the frequency and severity of epidemics on inflorescences is widely documented, because the fungus survives in the form of mycelium in buds and leaves during the growth season, or from previous years, when environmental conditions do not favor infection, or when there is no reproductive tissue (Schoeman *et al.*, 1995; Misra, 2001; Nasir *et al.*, 2014). When there are no flowers, early infection on young leaves perpetuates inoculum availability and favors the beginning of the infection on panicles (Munshi *et al.*, 1988; Misra *et al.*, 2012). Also, during flowering, sporulation on leaves (with conidia attached to conidiophores) increases inoculum development and preserves its viability from 10 to 19 (Gupta, 1989a; Nelson, 2008) or 40 more days (Khalid *et al.*, 2000) compared with free conidia deposited on other susceptible host organs, which favors longer lasting and more intense epidemics, given that conidia require only from 5 to 7 h to germinate, and from 5 to 8 days to induce the first symptoms (Misra, 2001). In turn, the multiple vegetative and floral flows that are simultaneously formed during the same growth season also

disponibilidad de inóculo y favorece el inicio de la infección en panículas (Munshi *et al.*, 1988; Misra *et al.*, 2012). Adicionalmente, durante la floración, la esporulación sobre las hojas (con los conidios adheridos a conidióforos) incrementa el inóculo y preserva su viabilidad de 10–19 (Gupta, 1989a; Nelson, 2008) o 40 días más (Khalid *et al.*, 2000), en comparación con los conidios libres depositados sobre otros órganos susceptibles del hospedante, lo cual favorece la mayor duración e intensidad de epidemias debido a que los conidios sólo requieren de 5–7 h para germinar y 5–8 días para inducir los primeros síntomas (Misra, 2001). A su vez, los múltiples flujos vegetativos y florales que se forman simultáneamente durante una misma estación de crecimiento también estimulan el incremento y dispersión masiva del inóculo y mayor frecuencia de epidemias (Misra, 2001; Guillén *et al.*, 2003). En Tecpan de Galeana, México, Pérez *et al.* (2017a) reportaron tres épocas de desarrollo de epidemias vegetativas en igual número de flujos de crecimiento durante un ciclo de cultivo en el cv. Manillila. Aunque la incidencia final fue menor (1.65-1.80%) que la observada en inflorescencias (6.15-6.90%), los autores mostraron la relevancia de la infección vegetativa en inducir la aparición de epidemias en tejido reproductivo.

En cultivares altamente susceptibles, los flujos vegetativos juveniles son severamente afectados por *E. quercicola*, por lo que usar cultivares tolerantes constituye la mejor alternativa de manejo de este patógeno (Nelson, 2008). En los actuales programas de mejoramiento de mango se estima la tolerancia varietal a patógenos con base en la infección natural registrada en campo. Con este enfoque, Galli *et al.* (2009) y (2012) caracterizaron la tolerancia de 17 cultivares a la cenicilla y antracnosis con cinco clases de severidad en Pindorama, Brasil. Similarmente, Nelson (2008) encontró que los cvs. Alphonso, Zill y Kent fueron altamente susceptibles; Rosa y Haden fueron moderadamente

stimulate massive inoculum increase and dispersion, and the frequency of epidemics (Misra, 2001; Guillén *et al.*, 2003). In Tecpan de Galeana, Mexico, Pérez *et al.* (2017a) reported three periods of vegetative epidemic development with the same number of growth flows during a Manillila cv. crop cycle. Although the final incidence was lower (1.65-1.80%) than that registered on inflorescences (6.15-6.90%), the authors showed the relevance of plant infections for inducing epidemics in reproductive tissue.

Since young vegetative flows in highly susceptible cultivars are severely affected by *E. quercicola*, using tolerant cultivars is the best management option for this pathogen (Nelson, 2008). In current mango breeding programs, varietal tolerance to pathogens is estimated based on natural infection recorded in the field. Using this approach, Galli *et al.* (2009) and (2012) characterized 17 cultivars for tolerance to powdery mildew and anthracnose using five severity classes in Pindorama, Brazil. Similarly, Nelson (2008) found that Alphonso, Zill and Kent cvs. were highly susceptible; Rosa and Haden moderately susceptible, and Sensation and Tommy Atkins, slightly susceptible to *O. mangiferae* in Hawaii, USA. Other similar studies to estimate powdery mildew tolerance were conducted by Palti *et al.* (1974), (1976), Peterson (1984), Akhtar *et al.* (1999), Galli *et al.* (2008), Nofal and Haggag (2006) and Naqvi *et al.* (2014). However, these methodological approaches have serious drawbacks, since the level of incidence and severity of powdery mildew in the field depends on factors such as seasonality, distribution and density of inoculum, availability of susceptible tissue and environmental conditions (Nasir *et al.*, 2014) or inductive management conditions such as frequency and intensity of irrigation (Guillén *et al.*, 2003).

To prevent infection escape and ensure the pathogen's optimal parasitic expression, it is

susceptibles, y Sensation y Tommy Atkins ligeramente susceptibles a *O. mangiferae* en Hawái, EE.UU. Otros estudios de este tipo para estimar la tolerancia a cenicilla fueron realizados por Palti *et al.* (1974), Gupta (1976), Peterson (1984), Akhtar *et al.* (1999), Galli *et al.* (2008), Nofal y Haggag (2006) y Naqvi *et al.* (2014). Sin embargo, estos enfoques metodológicos presentan inconvenientes severos, ya que la incidencia y severidad de cenicilla en campo dependerá de factores como la estacionalidad, distribución y densidad de inóculo, disponibilidad de tejido susceptible y de condiciones ambientales (Nasir *et al.*, 2014) o de manejo inductivos como la frecuencia e intensidad de riego (Guillen *et al.*, 2003).

Para evitar el escape a la infección y asegurar una óptima expresión parasítica del patógeno, es necesario utilizar técnicas estandarizadas de inoculación que reproduzcan con eficiencia la enfermedad. Debido a que *E. quercicola* es un parásito obligado, la mayoría de los estudios realizados para documentar su distribución, importancia, biología, epidemiología, manejo y resistencia genética se han basado en plantas infectadas naturalmente (Nasir *et al.*, 2014), por lo que existe escasa información referente a la inducción artificial de cenicilla del mango. Adikaram *et al.* (2002) documentaron que la deposición de esporas de *O. mangiferae* con pincel sobre hojas de *Pedilanthus tithymaloides* generó infecciones exitosas y promovió la esperada síntesis de nuevas antocianinas y degradación de clorofila. En estudios previos realizados en hojas de mango se observó que la mayor infección por *O. mangiferae* se registró en hojas de 8–12 días de edad, inoculadas al atardecer (300–350 Lux) con una concentración de 4.6×10^5 esporas mL⁻¹ (Pérez, 2017).

Con base en la susceptibilidad diferenciada que presentan todos los cultivares de mango a cenicilla (Palti *et al.*, 1974; Nasir *et al.*, 2014), la relevancia alta que tiene la infección foliar por *E. quercicola*

necesario to use standardized techniques that efficiently reproduce the disease. Given that *E. quercicola* is an obligate parasite, most of the studies conducted to document its distribution, importance, biology, epidemiology, management and genetic resistance have been based on naturally infected plants (Nasir *et al.*, 2014), and for this reason there is little information about the artificial induction of mango powdery mildew. Adikaram *et al.* (2002) reported that by depositing *O. mangiferae* spores on *Pedilanthus tithymaloides* leaves using a paint brush, they produced successful infections and promoted the expected synthesis of new anthocyanins and chlorophyll degradation. In previous studies conducted on mango leaves, the highest levels of *O. mangiferae* infection were observed in leaves of 8–12 day-old that were inoculated at dusk (300–350 Lux) at 4.6×10^5 spores mL⁻¹ (Pérez, 2017).

Based on the different susceptibility to powdery mildew that all mango cultivars shows (Palti *et al.*, 1974; Nasir *et al.*, 2014), the great influence of *E. quercicola* foliar infection on the disease cycle and epidemic development (Misra, 2001; Pérez *et al.*, 2017a), as well as the need to promote adequate selection and agronomic use of the new cultivars introduced or developed in Mexico, according to their sanitary reaction to the pathogen, this study was conducted to determine the response to *E. quercicola* at the vegetative stage of ten new yellow mango cultivars that have export potential using nursery plants and an optimized inoculation technique.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study was conducted in 2015 and 2016 at the laboratory and greenhouse of the Postgrado de

en el ciclo de la enfermedad y desarrollo epidémico (Misra, 2001; Pérez *et al.*, 2017a), así como la necesidad de apoyar la adecuada selección y uso agronómico de los nuevos cultivares introducidos o desarrollados en México acorde a su reacción sanitaria a este patógeno, se desarrolló este estudio con el objetivo de determinar la respuesta a *E. quercicola* en la etapa vegetativa de diez nuevos cultivares de mango amarillo con potencial de exportación en plantas de vivero con base en una técnica optimizada de inoculación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó durante 2015 y 2016 en el laboratorio e invernadero del Postgrado de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Iguala, Guerrero, México (18°20'39.505" N; 99°29'52.796" O; 738 msnm). Se usaron plantas de mango de 18 meses de edad injertadas con los cultivares Nam Doc Mai, Rosigold, Neelum, Mallika, Cotaxtla, Kesar, Fairchild, Alphonso, Ivory, Ataúlfo Zafiro y Manililla, establecidas en macetas de plástico de 18 L en un vivero cubierto con plástico transparente calibre 600 y malla-sombra de polipropileno al 50%. Las plantas se fertilizaron cada cinco días con 1.0 g de la fórmula 100-60-60 (NPK) y regaron a saturación cada tercer día. La temperatura, humedad relativa y fotoperiodo en el vivero se registraron cada dos horas con un datalogger Hobo® U12.

Inóculo experimental

Se recolectaron hojas e inflorescencias colonizadas por *E. quercicola* en huertos de mango cv. Manililla de 20 años de edad en Guerrero, México

la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias of the Universidad Autónoma de Guerrero, Iguala, Guerrero, México (18°20'39.505" N; 99°29'52.796" O; 738 masl). For the experiment, 18-month old mango plants grafted with Nam Doc Mai, Rosigold, Neelum, Mallika, Cotaxtla, Kesar, Fairchild, Alphonso, Ivory, Ataúlfo Zafiro and Manililla cultivars were placed in 18 L plastic pots in a nursery covered with 600-gauge transparent plastic and polypropylene mesh-shade at 50%. The plants were fertilized every five days using 1.0 g of a 100-60-60 (NPK) formulation and watered to the point of saturation every other day. Readings of temperature, relative humidity and photoperiod in the nursery were recorded every two hours using a datalogger Hobo® U12.

Experiment inoculum

Leaves and inflorescences colonized by *E. quercicola* were collected from 20 year-old Manililla cv. mango orchards in Guerrero, Mexico, and placed in paper bags for temporary conservation and transportation. Tissue was dehydrated for seven days under laboratory conditions (470 ± 10 lux, 24–26°C and 30% HR). One portion of dehydrated tissue was kept in paper bags as inoculum reservoir. From the remaining tissue, conidia were recovered using a fine hair paint brush (Rodin® No. 5). Then, they were suspended in glass tubes containing 30 mL of sterile distilled water and kept at 24 ± 2°C for later use as an inoculum source.

Inoculation treatments

Vegetative sprouts with initial disease development were identified on Manililla cv. plants highly susceptible to *E. quercicola* and with similar growth and vigor characteristics. When leaves were 8-12 days-old, they were disinfected with NaClO

y depositaron en bolsas de papel para su conservación temporal y traslado. El tejido se deshidrató por siete días en condiciones de laboratorio (470 ± 10 lux, $24\text{--}26^\circ\text{C}$ y 30% HR). Una porción de tejido deshidratado se conservó en bolsas de papel como reservorio de inóculo, del resto se recuperaron los conidios con un pincel de pelo fino (Rodin® Núm. 5) y suspendieron en tubos de vidrio con 30 mL de agua destilada estéril para su conservación a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y uso posterior como fuente de inóculo.

Tratamientos de inoculación

Se identificaron brotes vegetativos con desarrollo inicial de la enfermedad en plantas del cv. Manililla, altamente susceptibles a *E. quercicola* y con características similares de crecimiento y vigor. Cuando las hojas tuvieron 8–12 días de edad se desinfestaron con un aspersor manual con NaClO (0.5%) durante 30 s, se enjuagaron tres veces con agua destilada y dejaron secar durante 10 min. Se evaluaron tres tratamientos de inoculación: T1) aspersión de conidios en suspensión en polisorbato 20 (Tween 20®) al 5% + surfactante a base de alcoholes detoxilados (Inex-A®) al 2%; T2) espolvoreo de una mezcla de conidios con caseína (Rennet Casein® 90 mesh, Charotar Casein Company, IndiaMart™), y T3) aspersión de agua destilada estéril (control). De cada tratamiento se preparó una mezcla base; para el T1 se utilizó 1 g de inóculo (micelio, conidios y conidióforos) en 2 mL^{-1} de la solución y para el T2 se usó 1 g de inóculo en 2 g de caseína y ambos se ajustaron a una concentración de 4.6×10^5 esporas mL^{-1} en una cámara de Neubauer. La inoculación se realizó a las 18:00 h ($\pm 300\text{--}450$ lux) en las superficies adaxial y abaxial de las hojas desinfestadas que permanecieron adheridas a la

(0.5%) for 30 s using a manual sprayer, rinsed three times with distilled water and dried for 10 min. Three inoculation treatments were evaluated: T1) spraying conidia suspended in polysorbate 20 (Tween 20®) at 5% + surfactant based on ethoxylated alcohols (Inex-A®) at 2%; T2) spraying a conidia mixture containing calcium caseinate (Rennet Casein® 90 mesh, Charotar Casein Company, IndiaMart™); and T3) spraying sterile distilled water (control). A base mixture was prepared from each treatment. For T1, we used 1 g of inoculum (mycelium, conidia and conidiophores) in 2 mL^{-1} of the solution; for T2, 1 g of inoculum in 2 g of casein, and then both were adjusted to a concentration of 4.6×10^5 spores mL^{-1} in a Neubauer chamber. Inoculation was done at 18:00 h ($\pm 300\text{--}450$ lux) on the adaxial and abaxial areas of disinfested leaves that remained attached to the plant. Fifty (50) leaves per treatment were inoculated (5 leaves per plant; 10 plants per treatment). The experiment was replicated three times in 2015.

Varietal tolerance

For this experiment, 18 month-old mango plants grafted with Nam Doc Mai, Rosigold, Neelum, Mallika, Cotaxtla, Kesar, Fairchild, Ivory, Alphonso and Ataulfo Zafiro cultivars were used. To replicate the symptoms, the most effective inoculation treatment from previous experiments, adjusted to 4.6×10^5 spores mL^{-1} , was applied to the adaxial and abaxial areas of leaves at a range of $\pm 300\text{--}450$ lux. Fifty (50) 8-12 day-old leaves attached to the plant were inoculated per cultivar (5 leaves per plant; 10 plants per cultivar). The experiment was replicated three times a year in 2015 and 2016.

planta. Se inocularon 50 hojas por tratamiento (5 hojas por planta; 10 plantas por tratamiento). El experimento se replicó tres veces en 2015.

Tolerancia varietal

Se evaluaron plantas de mango de 18 meses de injertadas con los cultivares Nam Doc Mai, Rosigold, Neelum, Mallika, Cotaxtla, Kesar, Fairchild, Ivory, Alphonso y Ataúlfo Zafiro. Se utilizó el tratamiento de inoculación más eficiente para reproducir síntomas derivado de experimentos previos, ajustado a 4.6×10^5 esporas mL⁻¹ e implementado en las superficies adaxial y abaxial de las hojas, en el rango de ± 300 –450 lux. Se inocularon 50 hojas adheridas a la planta de 8–12 días de edad por cultivar (5 hojas por planta; 10 plantas por cultivar). El experimento se replicó tres veces por año durante 2015 y 2016.

Variables y análisis estadístico

En ambos experimentos, tratamientos de inoculación y tolerancia varietal, cada 24 h se observó el desarrollo de hojas con lesiones, con o sin esporulación y determinó la incidencia (Inc), periodo de incubación (Pi) a severidad máxima (Y_{max}). Con los valores progresivos de Y_{max} se calculó la tasa de infección aparente (b^{-1}) mediante el modelo de regresión lineal (Achicanoy, 2000) y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) con el método de integración trapezoidal (Campbell y Benson, 1994). Adicionalmente, en el experimento de tolerancia varietal se cuantificó la concentración de conidios (Cc) por cm² de área foliar infectada según Sholberg *et al.* (2001) y estimó la tolerancia con una escala de cinco clases basada en el patrón

Variables and statistical analysis

The development of lesions on leaves, with and without sporulation, was observed every 24 h in both experiments (inoculation and varietal tolerance treatments), and this information was used to determine the incidence (Inc) and incubation period (Pi) to maximum severity (Y_{max}). Based on the progressive Y_{max} values, the apparent infection rate (b^{-1}) was calculated using the lineal regression model (Achicanoy, 2000), as well as the area under the disease progress curve (AUDPC) using the trapezoidal integration method (Campbell and Benson, 1994). Also, in the varietal tolerance experiment, the conidia concentration (Cc) per cm² of infected leaf area was quantified according to Sholberg *et al.* (2001), and the tolerance was estimated using a five-class scale based on the symptom pattern and degree of severity observed in commercial mango orchards located in Iguala and Huamuxtitlan, Guerrero, Mexico, as follows: 1) healthy leaf or with lesions ≤ 1.0 mm without mycelial colonization (resistant), 2) reddish lesions with little mycelium and 5.0 mm maximum diameter (moderately tolerant), 3) reddish to dark lesions 5–10 mm in diameter, and white mycelium (slightly tolerant), 4) reddish to dark lesions 10–15 mm in diameter, and abundant mycelium (susceptible), 5) coalescing dark lesions >15 mm in diameter and abundant mycelium (highly susceptible) (Figure 1). A completely randomized design with 10 replications was used in each experiment. Calculations of b^{-1} , AUDPC, variance analyses (Proc GLM) and mean comparisons (LSD, 5%) for Pi, Inc, Y_{max} , Cc, AUDPC and b^{-1} were performed using the SAS software v.9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

de síntomas y grado máximo de severidad observados en huertos comerciales de mango localizados en Iguala y Huamuxtitlán, Guerrero, México, como sigue: 1) hoja sana o con lesiones ≤ 1.0 mm sin colonización micelial (resistente), 2) lesiones rojizas, con micelio escaso y diámetro máximo de 5.0 mm (moderadamente tolerante), 3) lesiones rojizas a oscuras con diámetro de 5–10 mm y micelio blanco (ligeramente tolerante), 4) lesiones rojizas a oscuras con diámetro de 10–15 mm y micelio abundante (susceptible), 5) lesiones oscuras que coalescen con diámetro >15 mm y micelio abundante (altamente susceptible) (Figura 1). En cada experimento se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones. Los cálculos de b^{-1} , AB-CPE, análisis de varianzas (Proc GLM) y comparación de medias (DMS, 5%) para Pi, Inc, Y_{max} , Cc, ABCPE y b^{-1} se realizaron con el programa SAS System v.9.4 (SAS Institute Inc, 2016).

RESULTS

Inoculation treatments

The conidia suspension in polysorbate 20 + surfactant based on ethoxylated alcohols, sprayed at a concentration of 4.6×10^5 spore mL^{-1} on both surfaces of 8-12 day-old leaves and incubated at ± 300 –450 lux induced higher incidence, severity and AUDPC values with the shortest incubation period in Manila cv., which is highly susceptible to powdery mildew (Table 1) (LSD, $P \leq 0.05$).

Varietal tolerance

Based on Y_{max} , AUDPC and b^{-1} parameters, the infected cultivars by *E. quercicola* were grouped into four levels of susceptibility. Alphonso was moderately tolerant (MT) followed by Neelum

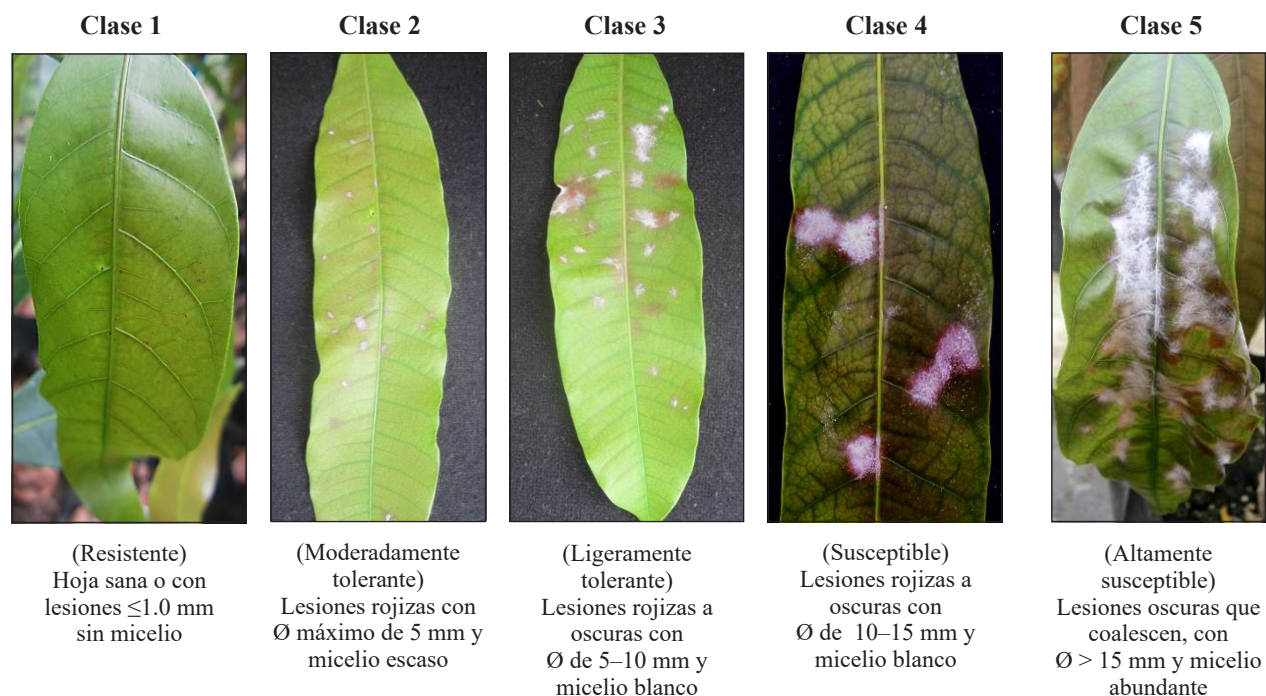


Figura 1. Diagrama de severidad de cenicilla causada por *Erysiphe quercicola* en hojas de mango (*Mangifera indica*) con base en el patrón de colonización observado en huertos comerciales de Guerrero, México, 2015.

Figure 1. Severity diagram of powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* in mango (*Mangifera indica*) leaves based on the colonization pattern observed in commercial orchards in Guerrero, México, 2015.

RESULTADOS

Tratamientos de inoculación

La suspensión de conidios en polisorbato 20 + surfactante a base de alcoholes detoxilados, asperjados a una concentración de 4.6×10^5 esporas mL⁻¹ sobre ambas superficies de hojas de 8 – 12 días de edad e incubadas a ± 300 –450 lux, indujo los valores mayores de incidencia, severidad y ABCPE con el menor periodo de incubación en el cv. Manilla, altamente susceptible a cenicilla (Cuadro 1) (DMS, $P \leq 0.05$).

Tolerancia varietal

Con base en los parámetros Y_{max} , ABCPE y b^{-1} , los cultivares infectados por *E. quercicola* se

and Fairchild, which were slightly tolerant (LT). Nam Doc Mai, Rosigold, Ataulfo Zafiro, Cotaxtla and Kesar were susceptible (S), and Ivory and Mallika, highly susceptible (AS) (Figure 2). Although none of the cultivars was resistant, the least susceptible ones (MT and LT) consistently showed lower incidence, Y_{max} , AUDPC, b^{-1} and Cc values. P_i ranged between 4 and 6 days, a period that did not show a pattern consistent with the level of susceptibility of the evaluated cultivars. The most susceptible cultivars (S and AS) showed 20.6–22.0% higher incidence, 33–38% higher Y_{max} , 95.5–140% higher AUDPC, 183–223% higher development rates (b^{-1}) and conidial concentration per damaged area (cm²) that was 226–300% higher compared to cultivars from the MT and LT groups. In this study, the polyembryonic cultivars Nam Doc Mai, Kesar, Cotaxtla, Ivory and Ataulfo Zafiro

Cuadro 1. Periodo de incubación, incidencia y severidad de cenicilla causada por *E. quercicola* en hojas de mango (*Mangifera indica* L.) de 8-12 días de edad del cv. Manilla infectadas mediante dos métodos de inoculación. Iguala, Guerrero, México. 2015.

Table 1. Incubation period, incidence and severity of powdery mildew caused by *E. quercicola* in 8-12 day-old mango (*Mangifera indica* L.) leaves Manilla cv. infected using two inoculation methods. Iguala, Guerrero, Mexico. 2015.

Tratamiento ^w	Parámetros fitosanitarios ^x				
	Pi (ddi)	Inc (%)	Y_{max}	ABCPE	b^{-1}
T1	5.0 ^z	90.1	4.8	107	0.4025
T2	7.2	72.3	3.5	43.7	0.3875
T3	0	0	0	0	0
DMS ^y	1.8	17.5	0.9	17.6	0.0973
R ²	88	90	90	91	89

^wT1= Polisorbato 20 + surfactante a base de alcoholes detoxilados, T2= caseína, T3= agua destilada estéril (control). ^xPi= periodo de incubación, Inc= incidencia, Y_{max} = severidad máxima, ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad, b^{-1} = tasa de infección aparente; ^yDMS= Diferencia mínima significativa de acuerdo con la prueba de Fischer ($P \leq 0.05$); ^zValores promedio de 50 hojas por tratamiento en tres réplicas experimentales / ^wT1= Polysorbate 20 + surfactant based on ethoxylated alcohols, T2= casein, T3= sterile distilled water (control). ^xPi= incubation period, days after inoculation, Inc= incidence, Y_{max} = maximum severity, ABCPE = area under the disease progress curve (AUDPC), b^{-1} = apparent infection rate; ^yDMS= Least Significant Difference (LSD), according to Fischer's Test ($P \leq 0.05$); ^zAverage values of 50 leaves per treatment in three experiment replications.

agruparon en cuatro niveles de susceptibilidad. Alphonso fue moderadamente tolerante (MT) seguido de Neelum y Fairchild, los cuales fueron ligeramente tolerantes (LT). Entretanto, Nam Doc Mai, Rosigold, Ataúlfo Zafiro, Cotaxtla y Kesar se comportaron como susceptibles (S) e Ivory y Mallika fueron altamente susceptibles (AS) (Figura 2). Aun cuando ningún cultivar fue resistente, los menos susceptibles (MT y LT) presentaron valores consistentemente menores de incidencia, Y_{max} , ABCPE, b^{-1} y Cc . El Pi osciló entre 4 y 6 días y su duración no mostró un patrón concordante con el grado de susceptibilidad de los cultivares evaluados. Los cultivares más susceptibles (S y AS) mostraron de 20.6–22.0% mayor incidencia, de 33–38% mayor Y_{max} , de 95.5–140% más ABCPE, tasas de desarrollo (b^{-1}) más altas de 183–223% y concentración conidial por área dañada (cm^2) de 226–300% superiores respecto a cultivares de los grupos MT y LT. En este estudio, los cultivares poliembriónicos Nam Doc Mai, Kesar, Cotaxtla, Ivory y Ataúlfo Zafiro fueron más susceptibles que los monoembriónicos (Cuadro 2) (DMS, $P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

La aspersión del inóculo conidial de *E. quercicola*, en suspensión con una mezcla de polisorbato 20 (5%) + surfactante a base de alcoholes detoxificados (2%) superó a la caseína en inducir la enfermedad con mayor incidencia (90.1%), severidad ($Y_{max} = 4.8$, ABCPE = 107) y rapidez (Pi = 5 ddi) en el cv. Manilla (Cuadro 1). Dada su mayor eficacia, este método de inoculación se utilizó para evaluar la respuesta a la infección en los cultivares considerados en este estudio. No se encontraron estudios relativos al efecto del polisorbato 20 en la germinación conidial de *E. quercicola*. Sin embargo, por sus características tensioactivas, adherentes

were more susceptible than the monoembryonic types (Table 2) (LSD, $P \leq 0.05$).

DISCUSSION

Spraying conidial inoculum of *E. quercicola* suspended in a mixture of polysorbate 20 (5%) + surfactant based on ethoxylated alcohols (2%) was more effective than casein to induce the disease with a higher level of incidence (90.1%), severity ($Y_{max} = 4.8$, AUDPC = 107) and speed (Pi = 5 ddi) in the Manilla cv. (Table 1). Since it proved to be more effective, this inoculation method was used to evaluate the response of cultivars to infection in this study. No studies were found on the effect of polysorbate 20 on *E. quercicola* conidial germination. However, because of its surfactant, adherent and dispersant properties, polysorbate 20 has been used in some studies to prevent spore agglutination and enable uniform spore dispersion. For example, Jansen *et al.* (2005) achieved 100% successful infections by inoculating wheat caryopses with *Fusarium graminearum* at a concentration of 1500 macroconidia mL^{-1} suspended in polysorbate 20. Similarly, Frias *et al.* (1995) favored germination and obtained from 97 to 100% infection by inoculating cacao (*Theobroma cacao*) seedlings with *Crinipellis perniciosus* basidiospores suspended in a polysorbate 20 solution containing 3% glycerol. Similarly, Jia *et al.* (2003) observed that polysorbate 20 (0.25%) combined with 16 and 18 h light-darkness periods increased the levels of expected spores adherence and maximum severity of *Magnaporthe grisea* inoculated on rice (*Oryza sativa*) leaves.

In this study, we evaluated the reaction of 10 mango cultivars inoculated with *E. quercicola* using an optimized technique that included the control of inoculum density and effective deposition on foliar

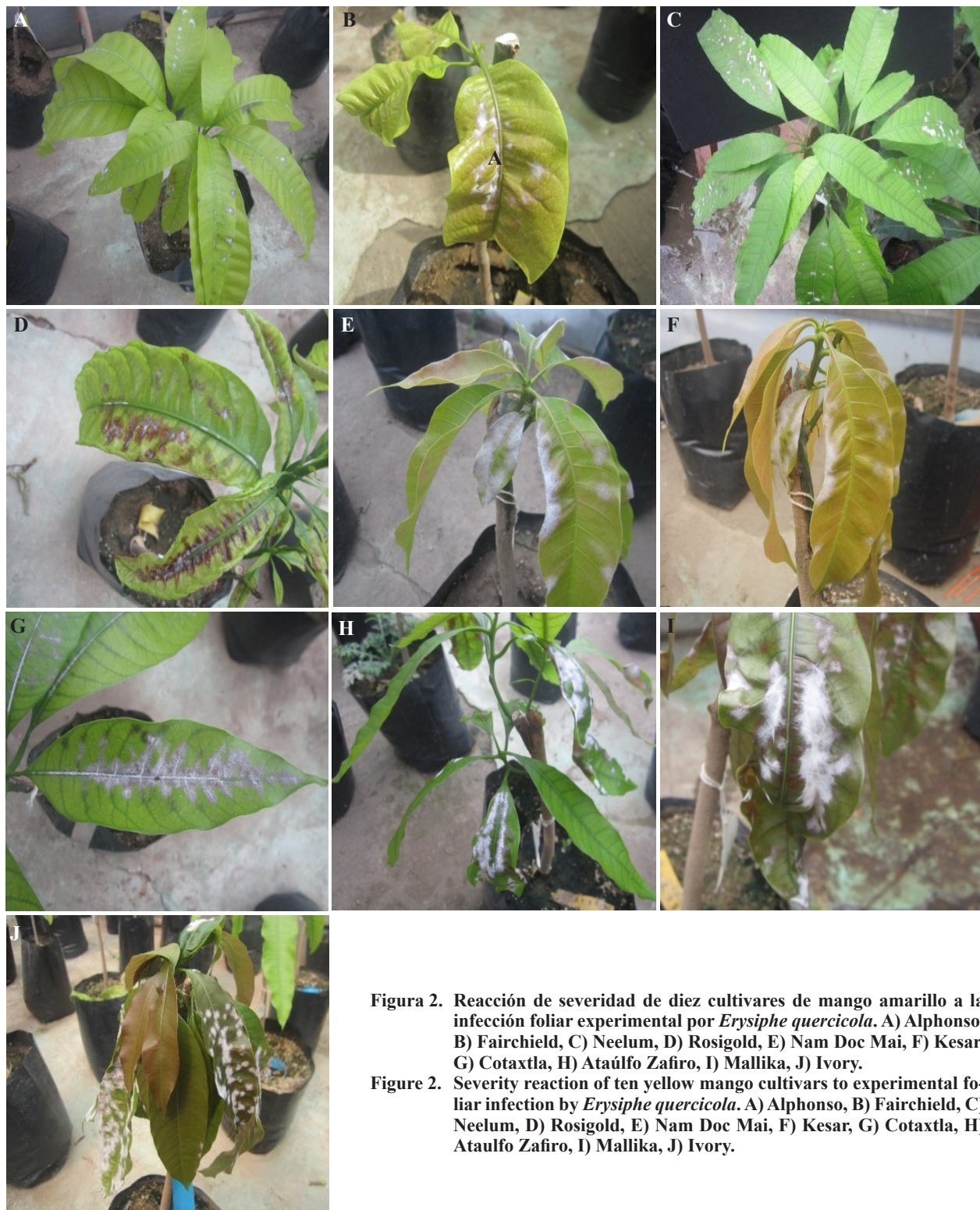


Figura 2. Reacción de severidad de diez cultivares de mango amarillo a la infección foliar experimental por *Erysiphe quercicola*. A) Alphonso, B) Fairchild, C) Neelum, D) Rosigold, E) Nam Doc Mai, F) Kesar, G) Cotaxtla, H) Ataulfo Zafiro, I) Mallika, J) Ivory.

Figure 2. Severity reaction of ten yellow mango cultivars to experimental foliar infection by *Erysiphe quercicola*. A) Alphonso, B) Fairchild, C) Neelum, D) Rosigold, E) Nam Doc Mai, F) Kesar, G) Cotaxtla, H) Ataulfo Zafiro, I) Mallika, J) Ivory.

Cuadro 2. Tolerancia de diez cultivares de mango inoculados con *Erysiphe quercicola* en hojas de 8-12 días de edad con base en algunos parámetros fitosanitarios en Iguala, Guerrero, México, durante los ciclos 2015 y 2016.

Table 2. Tolerance of 10 mango cultivars inoculated with *Erysiphe quercicola* in 8-12 day-old leaves based on some phytosanitary parameters in Iguala, Guerrero, Mexico, during the 2015 and 2016 cycles.

Cultivar	Parámetros fitosanitarios ^w							Semilla ^x
	Pi (ddi)	Inc (%)	Y _{max}	Cc (10 ⁴ /cm ²)	ABCPE	b ⁻¹	Reacción	
Alphonso	6.3 ^z	70.1	2.7	1213.5	38.1	0.121	MT	M
Fairchild	4.7	75.3	3.0	1305.1	43.7	0.132	LT	M
Neelum	4.6	83.1	3.4	3685.2	50.2	0.265	LT	M
Rosigold	6.1	86.2	3.6	3961.4	74.5	0.347	S	M
Nam Doc Mai	5.3	84.0	3.8	4283.6	83.4	0.305	S	P
Kesar	4.2	91.0	4.1	4600.3	90.3	0.368	S	P
A. Zafiro	4.8	90.8	4.3	5221.4	96.1	0.378	S	P
Cotaxtla	4.9	91.2	4.4	5183.6	97.5	0.371	S	P
Mallika	5.1	90.5	4.7	5981.7	100.6	0.389	AS	M
Ivory	4.6	93.3	4.7	6321.6	105.8	0.423	AS	P
DMS ^y	1.1	9.3	0.9	1115.8	17.7	0.101	-	-
R ²	91	89	90	88	89	87	-	-

^wPi= período de incubación, Inc= incidencia, Sev= severidad, Cc= concentración de conidios por área dañada, Y_{max} = severidad máxima, ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad, b⁻¹= tasa de infección aparente; ^xM= monoembriónica, P= poliembriónica; ^yDMS=Diferencia mínima significativa de acuerdo con la prueba de Fischer (P≤0.05); ^zMedia de 50 hojas por tratamiento en seis réplicas experimentales / ^wPi= incubation period, days after inoculation, Inc= incidence, Sev= severity, Cc= conidia concentration per damaged area, Y_{max} = maximum severity, ABCPE = area under the disease progress curve (AUDPC), b⁻¹= apparent infection rate; ^xM= monoembryonic, P= polyembryonic; ^yDMS= Least Significant Difference (LSD), according to Fischer's Test (P≤0.05); ^zaverage of 50 leaves per treatment in six experiment replications.

y dispersantes, el polisorbato 20 se ha utilizado en algunas investigaciones para evitar la aglutinación de esporas y facilitar su dispersión uniforme. Por ejemplo, Jansen *et al.* (2005) lograron infecciones 100% exitosas al inocular carióspsides de trigo con *Fusarium graminearum* a concentración de 1500 macroconidios mL⁻¹ suspendidos en polisorbato 20. Similarmente, Frias *et al.* (1995) favorecieron la germinación y lograron 97 – 100% de infección al inocular plántulas de cacao (*Teobroma cacao*) con basidiosporas de *Crinipellis pernicioso* suspendidas en una solución de polisorbato 20 con glicerol al 3%. Similarmente, Jia *et al.* (2003) observaron que el polisorbato 20 (0.25%), combinado con periodos de luz-oscuridad por 16 y 8 h, incrementaron la adherencia y severidad máxima esperada de

tissue, moisturizing additives to prevent conidia dehydration, as well as susceptible host phenology stages and optimal incubation conditions. The lack of this kind of studies limits the precise estimation of varietal tolerance to *E. quercicola*, since evaluating tolerance based on natural epidemics, as it is usually done (Akthar *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2008; Nelson, 2008), may lead to wrong conclusions because the occurrence and intensity will be affected by the presence, density and variable distribution of the inoculum, heterogeneous environmental conditions and the availability of susceptible tissue, among other factors (Shoeman *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 2014).

Our results indicated that all the cultivars were susceptible to *E. quercicola* and grouped into

Magnaporthe grisea inoculado en hojas de arroz (*Oryza sativa*).

En este estudio se evaluó la reacción de diez cultivares de mango inoculados con una técnica optimizada que consideró el control de la densidad inóculo y deposición eficiente en el tejido foliar, aditivos humectantes para evitar la deshidratación de conidios, así como la fenología del hospedante asociada a la susceptibilidad y condiciones óptimas de incubación. La carencia de este tipo de estudios limita la estimación precisa de tolerancia varietal a *E. quercicola*, ya que evaluar este comportamiento con base en epidemias naturales, como comúnmente se realiza (Akthar *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2008; Nelson, 2008), puede llevar a conclusiones equivocadas debido a que la ocurrencia e intensidad estarán afectadas por la presencia, densidad y distribución variable del inóculo, condiciones ambientales heterogéneas y disponibilidad de tejido susceptible, entre otros factores (Shoeman *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 2014).

Nuestros resultados indicaron que todos los cultivares fueron susceptibles a *E. quercicola* y se agruparon en cuatro niveles de susceptibilidad como fue reportado por Naqvi *et al.* (2014), quienes encontraron que de un total de 25 cultivares de mango, ninguno fue resistente, pero si exhibieron gradientes de tolerancia. En nuestro estudio, el cv. Alphonso mostró la mayor tolerancia a *E. quercicola*, en contraste con Nofal y Haggag (2006), quienes documentaron una susceptibilidad alta de este cultivar. Sin embargo, Neelum y Fairchild presentaron ligera tolerancia como fue documentado por Nasir *et al.* (2014). Los cultivares más susceptibles fueron Mallika e Ivory, coincidiendo con lo observado por Palti *et al.* (1974) y Nofal y Haggag (2006). Adicionalmente, la presente investigación consigna por primera vez el grado de susceptibilidad del follaje a *E. quercicola* en cultivares de mango nuevos para México (Nam Doc Mai, Rosigold, Ataulfo

four susceptibility levels as reported by Naqvi *et al.* (2014), who tested 25 mango cultivars and found that although none of them was resistant, they exhibited levels of tolerance. In our study, cv. Alphonso showed the highest tolerance to *E. quercicola*, in contrast to Nofal and Haggag (2006), who indicated that this cultivar was highly susceptible. However, Neelum and Fairchild showed slight tolerance, as reported by Nasir *et al.* (2014). The most susceptible cultivars were Mallika and Ivory, and this result coincides with that obtained by Palti *et al.* (1974) and Nofal and Haggag (2006). Also, the present study reports for the first time the degree of vegetative susceptibility to *E. quercicola* in new mango cultivars for Mexico (Nam Doc Mai, Rosigold, Ataulfo Zafiro and Kesar), which have export potential. It is important to consider that the cultivars with the lowest susceptibility consistently showed lower incidence, Y_{max} , accumulated severity (AUDPC), rate of disease development and sporulation density, and that the ranges of magnitude of those values were in agreement with each susceptibility group (MT, LT, S and AS) (Table 2).

It is important to note that the previously cited tolerance comparisons were based on natural epidemics (Galli *et al.*, 2008, 2009; Naqvi *et al.*, 2014), in which conditions to promote the maximum expression of the pathogen virulence and disease development were not controlled, so the level of severity may have been underestimated or overestimated. Nasir *et al.*, (2014) documented the differentiated virulence of *O. mangiferae* in terms of the level of environmental humidity and length of the driest environmental periods. For this reason, it is important to use effective and standardized methods to reproduce the disease under controlled conditions (laboratory, glass houses or other protected spaces), as well as integrate the greater number of phytosanitary variables and use severity

Zafiro y Kesar) y con potencial de exportación. Es relevante considerar que los cultivares con menor susceptibilidad presentaron consistentemente menor incidencia, Y_{max} , severidad acumulada (ABC-PE), tasa de desarrollo de la enfermedad, así como densidad de esporulación y los rangos de magnitud de estos valores guardaron concordancia con cada grupo o respuesta de susceptibilidad (MT, LT, S y AS) (Cuadro 2).

Es importante señalar que las comparaciones de tolerancia previamente citadas se han basado en epidemias naturales (Galli *et al.*, 2008, 2009; Naqvi *et al.*, 2014), en donde no se controlaron las condiciones para promover la óptima expresión de virulencia del patógeno y el desarrollo de la enfermedad, por lo que la severidad pudo ser subestimada o sobrestimada. Nasir *et al.* (2014) documentaron la virulencia diferenciada de *O. mangiferae* en función del grado de humedad ambiental y duración de los periodos ambientales más secos. Por esta razón, es importante usar métodos eficaces y estandarizados para reproducir la enfermedad en condiciones controladas (laboratorio, invernaderos u otros espacios protegidos) para la correcta estimación de tolerancia, además de integrar en el estudio mayor número de variables fitosanitarias para lograr resultados más consistentes y usar una escala de severidad diseñada acorde al patrón de síntomas y grado máximo de severidad observado en huertos comerciales de mango (Figura 1) de las regiones productoras de cada país en particular.

Todos los cultivares poliembriónicos (Nam Doc Mai, Kesar, Cotaxtla, Ivory y Ataúlfo Zafiro) mostraron mayor susceptibilidad al agruparse como S y AS; sin embargo, como en estas categorías también se agruparon cultivares monoembriónicos (Rosigold y Mallika) (Cuadro 2), esta relación debe verificarse en futuros estudios comparativos con mayor número de cultivares de cada tipo embrionario. Aportar evidencias de la participación de

scales based on the symptomatic pattern and maximum severity degree observed in commercial orchards (Figure 1) located in particular mango-producing regions to estimate the varietal tolerance more accurately.

All the polyembryonic cultivars (Nam Doc Mai, Kesar, Cotaxtla, Ivory and Ataúlfo Zafiro) showed greater susceptibility when they grouped as S and AS. However, since monoembryonic cultivars (Rosigold and Mallika) were also grouped into those categories (Table 2), this relationship must be verified when doing future comparative studies on a greater number of cultivars of each embryonic type. It is important to provide evidence of the participation of this factor, since it suggests that polyembryony in mango promotes susceptibility to foliar diseases because it causes peroxidase activity and ethylene synthesis to decrease (Campbell, 1961) in contrast to soil pathogens, where the resistance increases (Pinto *et al.*, 2002).

Powdery mildew develops in a wide temperature range (10-31 °C) (Ploetz and Freeman, 2009), although it is more severe in dry and cold environments (50-70% RH, \approx 20-22°C) (Gupta, 1989b; Schoeman *et al.*, 1995). Conidia can germinate in a range from 9 to 32°C (being the optimum 23°C) with relative humidity as low as 20%, so disease development does not usually depend on environmental moisture (Ploetz and Freeman, 2009). Mango-producing areas in the Mexico's Pacific basin have climatic gradients (dry, humid and subhumid tropics) with different inductivity to powdery mildew. For example, in dry tropical regions such as the Apatzingan Valley (Michoacan, Mexico), powdery mildew shows high levels of severity, damages leaves and reproductive tissue, and causes up to 80% of fruits to fall. In this region, Arias *et al.* (2004) classified as high-risk areas for this disease those at altitudes higher than 550 m where night temperatures can reach <17 °C.

este factor es relevante, ya que se sugiere que la poliembrionía en mango promueve susceptibilidad a enfermedades foliares al originar baja actividad de peroxidasa y síntesis de etileno (Campbell, 1961), en contraste con patógenos del suelo donde incrementa la resistencia (Pinto *et al.*, 2002).

El desarrollo de cenicilla ocurre en un rango amplio de temperatura (10-31 °C) (Ploetz y Freeman, 2009), aunque es más severa en ambientes secos y fríos (50-70% RH, \approx 20-22°C) (Gupta, 1989b; Schoeman *et al.*, 1995). Los conidios pueden germinar en un rango de 9-32°C (con un óptimo de 23°C) con humedad relativa tan baja como 20%, por lo que el desarrollo de la enfermedad es usualmente independiente de la humedad ambiental (Ploetz y Freeman, 2009). Las zonas de producción de mango de la cuenca pacífico de México presentan gradientes climáticos (trópico seco, húmedo y subhúmedo) con distinta inductividad a cenicilla. Por ejemplo, en regiones de trópico seco como el Valle de Apatzingán (Michoacán, México), la cenicilla se presenta con alta severidad, ataca hojas y tejido reproductivo y causa caída de frutos de hasta 80%; en esta región, Arias *et al.* (2004) clasificaron como zonas de alto riesgo para esta enfermedad las ubicadas a una altitud mayor a 550 m y expuestas a temperatura nocturna $<$ a 17 °C. En concordancia con este supuesto, Pérez *et al.* (2017b) reportaron el desarrollo de epidemias de baja severidad (2.98%) y únicamente en inflorescencias en huertos de Arcelia, Gro., (trópico seco), municipio ubicado a 330 m, con temperatura \geq 30 °C y RH \leq 60% durante el estudio. En contraste, en zonas de trópico subhúmedo, como Tecpan de Galeana (Guerrero, México), la presencia recurrente de vientos marinos fríos favorece la aparición de flujos vegetativos y florales múltiples que prolongan las etapas fenológicas de mayor susceptibilidad y también promueven epidemias múltiples de cenicilla (Pérez *et al.*, 2017a) con distinta intensidad. Con base en

In agreement with this assumption, Pérez *et al.* (2017b) reported the development of low-severity epidemics (2.98%) and only on inflorescences in orchards located in Arcelia, Guerrero (dry tropics), a municipality located at 330 masl, with \geq 30 °C temperature and \leq 60% RH during the study. In contrast, in subhumid tropical areas such as Tecpan de Galeana (Guerrero, Mexico), the recurrent presence of cold sea winds favors the appearance of multiple vegetative and floral flows that extend the phenological stages of higher susceptibility, and promote multiple powdery mildew epidemics (Pérez *et al.*, 2017a) of varying intensity. In view of the above, this study supports the selection of agroecological regions that are more adequate for growing new yellow mango cultivars for the export market. For example, cultivars in high demand in the US and Canadian markets, such as Nam Doc Mai, Alphonso and Kesar, will have a better productive performance and higher profitability in regions where *E. quercicola* shows less parasitic aptitude and the financial costs for phytosanitary maintenance will be lower. However, the farmer should consider factors such as the susceptibility of the new cultivars to other important pathogens and their agronomic adaptation to weather and soil types when making his decision.

Except for Cotaxtla, the other cultivars evaluated in this study were recently established in experimental orchards in Guerrero, Oaxaca and Chiapas, Mexico, so they are at a young stage. Once they mature, we will continue our studies on varietal response to *E. quercicola* infection in reproductive tissues.

CONCLUSIONS

In this study, it was determined that the best method for inoculating *E. quercicola* in mango was

lo anterior, este estudio permite apoyar la selección de regiones agroecológicas más adecuadas para los nuevos cultivares de mango amarillo emergentes para el mercado de exportación. Por ejemplo, cultivares altamente demandados por los mercados de EE.UU. y Canadá, como Nam Doc Mai, Alphonso y Kesar, tendrán mejor comportamiento productivo y mayor rentabilidad en las regiones donde *E. quercicola* muestra menor aptitud parasítica y los costos financieros por mantenimiento fitosanitario serán menores. Sin embargo, el productor deberá considerar factores como la susceptibilidad de los nuevos cultivares a otras limitantes parasíticas importantes y adaptación agronómica a tipos de clima y suelo para ponderar mejor su decisión.

Con excepción de Cotaxtla, el resto de los cultivares evaluados en este estudio se establecieron recientemente en huertos experimentales ubicados en Guerrero, Oaxaca y Chiapas, México, por lo que se encuentran en etapa juvenil. Una vez que alcancen la madurez continuarán los estudios de respuesta varietal a la infección por *E. quercicola* en tejidos reproductivos

CONCLUSIONES

En este estudio se determinó que el mejor método de inoculación de *E. quercicola* en mango fue por aspersión de conidios a una concentración de 4.6×10^5 esporas mL^{-1} , en ambas superficies de las hojas, al anochecer y suspendidos en polisorbato 20 + surfactante a base de alcoholes detoxilados al 2% para favorecer su dispersión, adherencia y evitar su deshidratación. Además, aun cuando los 10 cultivares de mango evaluados en este estudio fueron susceptibles a *E. quercicola*, Alphonso, Neelum y Fairchild fueron los más tolerantes a la infección foliar. Mientras que Mallika e Ivory fueron los más susceptibles.

to spray conidia at 4.6×10^5 spore mL^{-1} on both leaf areas, at dusk and suspended in polysorbate 20 + surfactant based on 2% ethoxylated alcohols to favor its dispersion and prevent dehydration. Although the 10 mango cultivars evaluated in this study were susceptible to *E. quercicola*, Alphonso, Neelum and Fairchild were the most tolerant to foliar infection, while Mallika and Ivory were the most susceptible.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank to the authorities of the Postgrado de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Guerrero for the facilities provided to carry out this work.

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

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las autoridades de Postgrado de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Guerrero por las facilidades otorgadas para realizar el presente trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Achicanoy LH. 2000. Descripción cuantitativa de epidemias de plantas. Revista de la Facultad Nacional de Agricultura de Medellín 53(1):941-968. Disponible en línea: <http://www.bdigital.unal.edu.co/26473/1/24069-84222-1-PB.pdf>
- Adikaram NKB, Mlewa G and Weerahewa D. 2002. Changes in pigment composition, acid metabolism, etc. in *Pedilanthus tithymaloides* leaf following powdery mildew infection. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka 30:1-11. DOI: 10.4038/jnsfr.v30i1-2.2556
- Akhtar KP, Khan MA, Kazmi MR, Hussain RI and Fatima B. 1999. Preventive control of powdery mildew disease of mango. Agricultural Sciences 4(1):23-28. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/289519342\\_Preventive\\_control\\_of\\_powdery\\_mildew\\_of\\_mango](https://www.researchgate.net/publication/289519342_Preventive_control_of_powdery_mildew_of_mango)



- Arias SJF, Espinosa AJ, Rico PHR, Miranda SMA y Chávez CX. 2004. La cenicienta *Oidium mangiferae* Berthet del mango en Michoacán. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Valle de Apatzingán. Folleto Técnico Núm. 1. Apatzingán, Michoacán, México. Disponible en línea: [http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1288/cenicilla\\_1288.pdf?sequence=1](http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1288/cenicilla_1288.pdf?sequence=1)
- Braun U and Cook RTA. 2012. Taxonomic manual of the *Erysiphales* (Powdery Mildews). CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 707 p. Disponible en línea: <https://www.nhbs.com/taxonomic-manual-of-the-erysiphales-powdery-mildews-book>
- Campbell CW. 1961. Comparison of yield of poliembryonic and monoembryonic mangos. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 74: 363-365. Disponible en línea: [http://fshs.org/proceedings-o/1961-vol-74/363-365%20\(CAMPBELL\).pdf](http://fshs.org/proceedings-o/1961-vol-74/363-365%20(CAMPBELL).pdf)
- Campbell CL and Benson DM. 1994. Spatial aspects of the development of root disease epidemics. Pp. 195-243. In: Campbell CL and Benson DM. (eds.). Epidemiology and management of root diseases. Berlin: Springer-Verlag. 339p. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9_7)
- FAO. 2016. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en línea: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>
- Félix GR, Herrera RG, Martínez VC, Longoria ERM, Maldonado MIE, Quiroz FFR, Martínez AJC, García PLM and Espinoza MS. 2013. First report of powdery mildew (*Pseudoidium anacardii*) of mango trees in Sinaloa, Mexico. Plant Disease 97(7):994. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1014-PDN>
- Félix GR, Maldonado MIE, Beltrán PH, Apodaca SMA, Espinoza MS, Martínez VMC, Longoria ERM and Olivas PNG. 2017. Powdery mildews in agricultural crops of Sinaloa: Current status on their identification and future research lines. Revista Mexicana de Fitopatología 35:106-129. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1607-4
- Frias GA, Purdy LH and Schmidt RA. 1995. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. Plant Disease 79:787-791. Disponible en línea: [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1995Articles/PlantDisease79n08\\_787.PDF](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1995Articles/PlantDisease79n08_787.PDF)
- Galli JA, Fischer IH and Palharini MCA. 2012. Pre and post-harvest diseases in mango varieties cultivated in organic system. Revista Brasileira de Fruticultura 34(3):734-743. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000300012>
- Galli JA, Silveira LCP, Michelotto MD and Martins ALM. 2008. Powdery mildew (*Oidium mangiferae* Bert.) infection in mango varieties. Bioscience Journal 24(2):43-46. Disponible en línea: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6744/4451>
- Galli JA, Silveira LCP, Michelotto MD and Martins ALM. 2009. Evaluation of anthracnose incidence, development and nutritional status of mango trees varieties for organic cultivation in north center region of São Paulo state. Revista Brasileira de Fruticultura 31(3):701-709. Disponible en línea: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v31n3/a12v31n3.pdf>
- Guillén SD, Téliz OD, Mora AG, Mora AA, Sánchez GP y González HV. 2003. Desarrollo temporal de epidemias de cenicienta (*Oidium mangiferae* Berthet) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) en Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21(2):181-188. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/html/612/61221213/index.html>
- Gupta JH. 1976. Reaction of mango varieties to powdery mildew (*Oidium mangiferae*) in Uttar Pradesh. Progressive Horticulture 8:63-64.
- Gupta JH. 1989. Longevity of conidia of *Oidium mangiferae* causing powdery mildew of mango. Indian Journal Mycology and Plant Pathology 19:123-124.
- Gupta JH. 1989b. Perpetuation and epidemiology of powdery mildew of mango. Acta Horticulture 231:528-533. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1989.231.4>
- Hernández SD y Martínez DMA. 2009. Procedimiento para el análisis de equilibrio parcial de las exportaciones mexicanas de mango (*Mangifera indica*) a EE.UU. Revista Fitotecnia Mexicana 32(3):251-256. Disponible en línea: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/32-3/10a.pdf>
- Jansen C, Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk A and Maier FJ. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 102(46):16892-16897. Disponible en línea: <http://www.pnas.org/content/102/46/16892.full.pdf>
- Jia Y, Valent B and Lee FN. 2003. Determination of host responses to *Magnaporthe grisea* on detached rice leaves using a spot inoculation method. Plant Disease 87:129-133. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/249303304\\_Determination\\_of\\_Host\\_Responses\\_to\\_Magnaporthe\\_grisea\\_on\\_Detached\\_Rice\\_Leaves\\_Using\\_a\\_Spot\\_Inoculation\\_Method](https://www.researchgate.net/publication/249303304_Determination_of_Host_Responses_to_Magnaporthe_grisea_on_Detached_Rice_Leaves_Using_a_Spot_Inoculation_Method)
- Khalid P, Akhtar and Alam SS. 2000. Powdery mildew of mango: a review. Pakistan Journal of Biological Sciences 3 (7):1119-1122. Disponible en línea: <http://scialert.net/redirect.php?doi=pjbs.2000.1119.1122&linkid=pdf>
- Misra AK. 2001. Powdery mildew - A serious disease of mango. Journal of Applied Horticulture 3(1):63-68. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/281590887\\_Powdery\\_mildew\\_-\\_A\\_serious\\_disease\\_of\\_mango](https://www.researchgate.net/publication/281590887_Powdery_mildew_-_A_serious_disease_of_mango)
- Misra AK, Shukla PK and Pandey BK. 2012. Diseases of Mango. Pp. 278-335. In: Diseases of fruit crops. Misra AK, Chowdappa P, Sharma P and Khetrpal RK. (eds.). Indian Phytopathological Society. New Delhi. 342p. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/311886856\\_Diseases\\_of\\_Mango](https://www.researchgate.net/publication/311886856_Diseases_of_Mango)
- Munshi GD, Jhooty JS and Jasmit K. 1988. Perennation of powdery mildew of mango as leaf infections. Indian Journal Mycology and Plant Pathology 18: 68-69.
- Naqvi SAH, Perveen R, Manzoor SA, Umar HMI, Iqbal MT, Liaquat F, Majid T and Irshad A. 2014. Evaluation of various mango varieties against the infection dynamics of powdery mildew (*Oidium mangiferae* Bert.). American Journal of Plant Sciences 5:2372-2377. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.515250>
- Nasir M, Mughal SM, Mukhtar T and Awan MZ. 2014. Powdery mildew of mango: a review of ecology, biology,



- epidemiology and management. *Crop Protection* 64:19-26. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.003>
- Nelson SC. 2008. Mango powdery mildew. Cooperative Extension Service. College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii at Manoa. Plant Disease: PD-46. Disponible en línea: <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-46.pdf>
- Nofal MA and Haggag WM. 2006. Integrated management of powdery mildew of mango in Egypt. *Crop Protection* 25:480-486. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.08.003>
- Palti J, Pinkays Y and Chorin M. 1974. Powdery mildew of mango. *Plant Disease Report* 58:45-49.
- Pérez RA. 2017. Tolerancia de cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) a la cenicilla (*Oidium mangiferae* Berthet.) en México. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Postgrado de Fitosanidad, Fitopatología. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 78p.
- Pérez RA, Monteon OA, Mora AA, Hernandez CE. 2017a. Epidemiology and strategies for chemical management of powdery mildew in mango. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 52(9):715-723. Disponible en línea: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v52n9/1678-3921-pab-52-09-00715.pdf>
- Pérez RA, Pérez RM, Talavera VA, García EP y Durán TY. 2017b. Manejo Químico de la cenicilla del mango y su interacción con factores ambientales. *Revista Mexicana de Fitosanidad* 1(3):30-37. Disponible en línea: [http://revimexfito.com.mx/files1/Remefi%201\\_3/REMEFI\\_30-37\\_2017.pdf](http://revimexfito.com.mx/files1/Remefi%201_3/REMEFI_30-37_2017.pdf)
- Peterson RA. 1984. Mango diseases. Pp: 233-247. In: *Proceedings of the First Australian Mango Research Workshop*, Cairns, Queensland. CSIRO. 392p. Disponible en línea: <http://catalog.lib.msu.edu/record=b1711286~S39a>
- Pinto ACQ, Costa JG and Santos CAF. 2002. Principais cultivares. Pp: 95-116. In: GENUÍ PJ de C and Pinto AC de Q (eds.). *A cultura da mangueira*. Brasília: Embrapa, Informação Tecnológica. 116p. Disponible en línea: <https://www.passeidireto.com/arquivo/1095467/a-cultura-da-mangueira>
- Ploetz RC and Freeman S. 2009. Foliar, floral and Soilborne Diseases. Pp. 231-302. In: *Litz RE (2nd ed.). The mango: botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 669p. <https://dx.doi.org/10.1079/%2F9781845934897.0000>
- Raheel M, Anwar SA, Javed N, Ilyas MB, Iqbal M and Zia A. 2008. Management of powdery mildew of mango by foliar spray fungicides. *Pakistan Journal of Phytopathology* 21:173-174. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/235816522\\_Management\\_of\\_powdery\\_mildew\\_of\\_mango\\_by\\_foliar\\_spray\\_fungicides](https://www.researchgate.net/publication/235816522_Management_of_powdery_mildew_of_mango_by_foliar_spray_fungicides)
- SAS Institute. 2016. SAS 9.4 OLAP server: User's Guide, SAS Institute. Fifth Edition. Cary, North Carolina, USA. Disponible en línea: [https://www.sas.com/es\\_mx/software/sas9.html](https://www.sas.com/es_mx/software/sas9.html)
- Schoeman MH, Manicom BQ and Wingfield MJ. 1995. Epidemiology of powdery mildew on mango blossoms. *Plant Disease* 79:524-528. DOI: 10.1094/PD-79-0524
- Sholberg PL, Lane WD, Haag P, Bedford K and Lashuk L. 2001. A novel technique for evaluation of apple (*Malus x domestica* Borkh) cultivars for susceptibility to powdery mildew. *Canadian Journal of Plant Science* 81(2):289.296. <https://doi.org/10.4141/P00-072>
- Sinha P, Prajneshu R and Varma A. 2001. Studies on determining favourable factors for the germination of conidia of *Oidium mangiferae*. *Indian Phytopathology* 54(2):197-200. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013126011>
- Sinha P, Prajneshu R and Varma A. 2002. Growth models for powdery mildew development of mango. *Annals of Plant Protection Sciences* 10(1):84-87. Disponible en línea: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:apps&volume=10&issue=1&article=020>
- Tam LTT. 2017. Identification powdery mildew *Erysiphe quercicola* damaging on mango in Hanoi, Vietnam. *Journal of Bacteriology and Mycology* 4(6):00111. DOI: 10.15406/jbmoa.2017.04.00111
- Villegas MA y Mora AA. 2011. Avances de la fruticultura en México. *Revista Brasileira de Fruticultura Vol. Especial: 179-186*. Disponible en línea: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33nspe1/a21v33nspe1.pdf>.

# Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*

## Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*

Nancy Ley-López, Isidro Márquez-Zequera, José Armando Carrillo-Fasio, Josefina León-Félix, Isabel Cruz-Lachica, Raymundo Saúl García-Estrada\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán. Km 5.5 Carretera Culiacán-El Dorado, Campo El Diez, CP. 80110. Culiacán, Sinaloa, México; Raúl Allende-Molar, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Carretera Tuxpan-Tampico km. 7.5 Tuxpan, Veracruz, México. \*Autor para correspondencia: rsgarcia@ciad.mx.

Recibido: 07 de Noviembre, 2017.

Aceptado: 04 de Febrero, 2018.

Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS, Allende-Molar R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-2

Primera publicación DOI: 06 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 06, 2018.

**Resumen.** El oomiceto *Phytophthora capsici* es un patógeno de importancia económica en los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de inhibición germinativa y biocontrol de dos aislados del género *Bacillus* sobre zoosporas de *P. capsici*. Los aislados fueron identificados como *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. En las pruebas *in vitro* de la germinación de zoosporas de *P. capsici*, los porcentajes de inhibición con suspensión celular

**Abstract.** The oomycete *Phytophthora capsici* is a pathogen of economic importance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and chili (*Capsicum annuum* L.) crops. The objective of this work was to evaluate the effect of germinative inhibition and biocontrol of two isolates of the genus *Bacillus* on zoospores of *P. capsici*. The isolates were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*. In the *in vitro* tests of the germination of zoospores of *P. capsici*, the percentages of inhibition with cell suspension of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* were significant with 88.15 and 97.05% respectively, while, the filtrates showed 24.30% of inhibition. In the *in vivo* study, tomato seedlings treated with cell suspension of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*, showed lower severity of the disease caused by *P. capsici* with 22.22 and 27.78% respectively, compared to that observed in chili seedlings where values of 61% were obtained. The tomato and chili seedlings treated with bacterial filtrates showed up to 94% severity. With cell suspension of *B. amyloliquefaciens* and

de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* fueron significativos con 88.15 y 97.05% respectivamente, mientras que, los filtrados mostraron el 24.30% de inhibición. En el estudio *in vivo*, las plántulas de tomate tratadas con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, mostraron menor severidad de la enfermedad ocasionada por *P. capsici* con 22.22 y 27.78% respectivamente, respecto a lo observado en plántulas de chile donde se obtuvo valores de 61%. Las plántulas de tomate y chile tratadas con filtrados bacterianos, mostraron hasta 94% de severidad. Con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* la eficacia de biocontrol fue 72 y 77% respectivamente, lo cual muestra que estos microorganismos pueden ser usados como agentes de biocontrol de *P. capsici* en plantas de tomate y chile.

**Palabras clave:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, fitopatógenos, oomiceto.

Los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.) son de importancia económica por su consumo en la dieta humana. México se posiciona en el décimo lugar en producción de tomate con 2,649,358 t y segundo lugar en chile, con una producción de 2,294,400 t (SIAP 2016). Sin embargo, la producción de ambos cultivos es afectada por enfermedades ocasionadas por diferentes patógenos; entre éstos, destaca el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian, el cual es un microorganismo fitopatógeno que causa serios daños económicos en la agricultura en todo el mundo (Chen *et al.*, 2016a). *P. capsici* ocasiona “damping-off”, pudrición de raíz, daño en tallo, hoja o pudrición de frutos en más de 50 especies de plantas hospedantes (Erwin y Riveiro, 1996; Khan *et al.*, 2011). Se ha reportado que este patógeno causa considerables pérdidas de rendimiento en

*B. thuringiensis* the efficiency of biocontrol was 72 and 77% respectively, which show that these microorganisms can be used as biocontrol agents of *P. capsici* in tomato and chili plants.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, phytopathogens, oomycete.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and chili (*Capsicum annuum* L.) are economically important crops because of their high consumption in the human diet. Mexico ranks tenth in tomato production with 2,649,358 t and second in chili production with 2,294,400 t (SIAP 2016). However, the production of both crops is affected by diseases caused by different pathogens, the most important being the oomycete *Phytophthora capsici* Leonian, which causes serious economic damage to agriculture worldwide (Chen *et al.*, 2016a). *Phytophthora capsici* causes “damping-off”, root rot, stem and leaf damage or fruit rot in more than 50 host plant species (Erwin and Riveiro, 1996; Khan *et al.*, 2011). The pathogen has been reported to cause considerable yield losses (15 to 45%), and even total chili, tomato and eggplant crop losses (González *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). The high soil moisture levels and warm weather that prevail in tomato and chili farms favor the spread and survival of *P. capsici* (Erwin and Riveiro, 1996).

Several strategies have been used to manage and control the pathogen, including cultural practices, resistant varieties (Yang *et al.*, 2015; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017), fungicide applications (Lamour *et al.*, 2012) and water management (Sanogo y Ji, 2013), but none of them individually have completely controlled the pathogen (Hausbeck and Lamour, 2004). Although several specific fungicides have quickly and effectively reduced disease severity, their indiscriminate use

la producción en un rango del 15 al 45% e incluso pérdida total de los cultivos de chile, tomate y berenjena (González *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). La alta humedad en el suelo y clima cálido que prevalece dentro de las plantaciones de tomate y chile, favorecen la dispersión y la sobrevivencia de *P. capsici* (Erwin y Riveiro, 1996).

En el manejo y control de este patógeno se han utilizado varias estrategias, incluyendo prácticas culturales, utilización de variedades resistentes (Yang *et al.*, 2015; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017), aplicación de fungicidas (Lamour *et al.*, 2012) y manejo del agua (Sanogo y Ji, 2013), pero ninguna de estas prácticas de manera individual ha logrado controlar al patógeno por completo (Hausbeck y Lamour, 2004). Aunque algunos fungicidas específicos han logrado reducir la severidad de la enfermedad en forma rápida y efectiva, su uso indiscriminado ha ocasionado la aparición de cepas resistentes y contaminación al ambiente (Qi *et al.*, 2012). Por lo anteriormente señalado, en la actualidad para el manejo de *Phytophthora* se han considerado nuevas alternativas, basadas en el control biológico, estrategia importante en el manejo de fitopatógenos que habitan en el suelo, ya que reducen la aplicación de agroquímicos (Nguyen *et al.*, 2012; Rios-Velasco *et al.*, 2016).

Distintos microorganismos han sido reportados por suprimir el crecimiento de *P. capsici*, incluyendo *Streptomyces* spp. (Ko *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012), *Paenibacillus* spp. (Naing *et al.*, 2014), *Trichoderma* sp. (Segarra *et al.*, 2013), *Clitocybe nuda* (Chen *et al.*, 2012) *Aspergillus* sp. (Kang y Kim, 2004) y *Bacillus* spp. (Zhang *et al.*, 2010). El género *Bacillus* ha sido más estudiado dentro del control biológico y las especies de este género se consideran candidatos ideales para el control de enfermedades, debido a su potencial antagónica (Zhao *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016). Los mecanismos de control incluyen la producción de

has led to the emergence of resistant isolates and environmental pollution (Qi *et al.*, 2012). For this reason, new alternatives based on biological control are being considered for managing *Phytophthora*, an important strategy in soil-borne phytopathogen management, since they reduce the application of agrochemicals (Nguyen *et al.*, 2012; Rios-Velasco *et al.*, 2016).

Different microorganisms have been reported to suppress *P. capsici* growth, including *Streptomyces* spp. (Ko *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012), *Paenibacillus* spp. (Naing *et al.*, 2014), *Trichoderma* sp. (Segarra *et al.*, 2013), *Clitocybe nuda* (Chen *et al.*, 2012) *Aspergillus* sp. (Kang and Kim, 2004) and *Bacillus* spp. (Zhang *et al.*, 2010). The *Bacillus* genus has been studied more as part of biological control, and species of this genus are considered ideal candidates for controlling diseases due to their antagonistic potential (Zhao *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016). Control mechanisms include the production of antibiotic and lytic enzymes, physical and chemical interference, competition, host resistance induction, hyperparasitism and predation (Pal and Gardener, 2006).

The objectives of the present study were to determine how *Bacillus* spp. affects germinative inhibition by using cells and bacterial filtrates *in vitro* on *P. capsici* zoospores and they can be used as biocontrol, in tomato and chili plants, as well as to identify those microorganisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The microorganisms used in this study were two antagonistic bacterial isolates of the *Bacillus* genus coded as B17 and B32, and a *Phytophthora capsici* isolate from the isolate pool at the Phytopathology

antibióticos y enzimas líticas, interferencia física o química, competencia, inducción de resistencia al hospedero, hiperparasitismo y predación (Pal y Gardener, 2006).

Los objetivos de este trabajo fueron, determinar el efecto de inhibición germinativa de *Bacillus* spp. mediante el uso de células y filtrados bacterianos sobre zoosporas de *P. capsici* a nivel *in vitro*, y su biocontrol en plantas de tomate y chile; así como la identificación de estos microorganismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron, dos aislados bacterianos antagonicos del género *Bacillus* codificados como B17 y B32 y la cepa *Phytophthora capsici* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. Las bacterias fueron aisladas de la rizósfera de campos agrícolas con cultivos de tomate y chile en distintas localidades geográficas de Sinaloa, se activaron en agar nutritivo (AN), se incubaron a 27 °C durante cinco días y se preservaron en buffer de fosfato a 4 °C hasta su uso. El patógeno *Phytophthora capsici*, se activó en medio de cultivo V8 (10% de jugo V8, 0.02% CaCO<sub>3</sub> y 1.5% agar) y se incubó a 27 °C hasta su uso (Chen *et al.*, 2016b).

### Identificación morfológica y molecular

Para confirmar que los aislados bacterianos en estudio pertenecieran al género *Bacillus*, se identificaron mediante morfología de las colonias, célula, tinción Gram y tinción de flagelos (Castillo *et al.*,

Laboratory of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. Bacteria were isolated from the rhizosphere of tomato and chili crops at different geographical locations in Sinaloa, activated in nutrient agar (NA), incubated at 27°C for five days and preserved in a phosphate buffer at 4°C until they were used. The *Phytophthora capsici* pathogen was activated in V8 culture medium (10% V8 juice, 0.02% CaCO<sub>3</sub> and 1.5% agar) and incubated at 27°C until it was used (Chen *et al.*, 2016b).

### Morphological and molecular identification

To confirm that the bacterial isolates belonged to the *Bacillus* genus, they were identified through colony morphology, cell, and Gram and flagella stains (Castillo *et al.*, 2004), as well as molecular techniques in the Phytopathology Laboratory of CIAD Unidad Culiacán and Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) at CINVESTAV's campus in Irapuato, Guanajuato, Mexico.

A purified colony with around 48-72 h of growth was used to identify the bacterial isolates. DNA extraction was carried out following the methodology of Heddi *et al.* (1999). Later, the 16S gene from DNAr was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) technique and FD2 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and RP1 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACC-3') universal primers that amplify a 1500 pb fragment. The amplification was performed in a Thermocycler 100 Thermal Cycler™ (Singapore). The time and temperature conditions were as follows: first, the enzyme was activated at 95 °C for 5 min, a second step consisted of 30 cycles including denaturation at 94°C for 1 min, an alignment step at 56°C for 1 min, an extension step at 72°C for 1 min and, when



2004); adicionalmente, se identificaron mediante técnicas moleculares en el Laboratorio de Fitopatología CIAD Unidad Culiacán y en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, *Campus* Irapuato, Gto., México.

Para identificar los aislados bacterianos se tomó una colonia purificada con alrededor de 48-72 h de crecimiento. La extracción de ADN, se realizó de acuerdo con la metodología de Heddi *et al.* (1999); subsecuentemente se realizó la amplificación de gen 16S del ADNr mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores universales FD2 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y RP1 (5'-TACCTTGTTACGACTT-CACC-3'), los cuales amplifican un fragmento de 1500 pb; la amplificación se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Singapore). Las condiciones de tiempo y temperatura incluyeron: un paso inicial de activación de la enzima a 95°C por 5 min, un segundo paso que comprendió 30 ciclos incluyendo una desnaturalización a 94°C por 1 min, un paso de alineamiento a 56°C por 1 min, un paso de extensión a 72°C por 1 min y cuando los ciclos se completaron, una extensión final a 72°C por 10 min (McLaughlin *et al.*, 2012).

Los fragmentos obtenidos de la PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en una cámara Powerpac™ Basic (BIO-RAD). Una vez detectado el fragmento esperado correspondiente a la región 16S, se purificó, se secuenció y se comparó su secuencia nucleotídica con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990); por último, las secuencias obtenidas fueron depositadas en el banco de genes del NCBI.

the cycles ended, a final extension step at 72°C for 10 min (McLaughlin *et al.*, 2012).

The PCR amplified fragments were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis in a Powerpac™ Basic chamber (BIO-RAD). Once detected, the expected fragment from the 16S region was purified and sequenced, and its nucleotidic sequence was compared to the sequences stored in the NCBI database (Altschul *et al.*, 1990). Finally, the obtained sequences were deposited in the NCBI gene bank.

### **Inhibiting germination of *P. capsici* zoospores using a suspension of *Bacillus* spp. cells**

The germination inhibition bioassay was conducted on concave slides. To induce *P. capsici* to produce sporangia, 5-mm agar disks with mycelium of the pathogen that had been growing for 5 days were taken and placed on Petri dishes to which 10 mL of distilled water were added, and incubated at 25-27°C for 48 h. To release the zoospores from the sporangia, the Petri dishes were incubated at 4°C for 30 min (Ko *et al.*, 2010) and a concentration of 20 zoospores/μL was obtained. Each slide concavity was filled with 20 μL of the zoospore suspension to which 20 μL of bacterial cell suspension of B17 and B32 isolates at a concentration of 1 x 10<sup>8</sup> colony forming units (CFU) 1:1 v/v were added, covered with a slide to prevent evaporation and incubated at 25-27°C for 24 h (Ko *et al.*, 2010). The zoospores that were not inoculated with the bacterial cell suspension were used as a control. To obtain the percentage of zoospore germination inhibition in the bioassays where cell suspension and bacterial filtrates were used, 100 zoospores



### **Inhibición germinativa de zoosporas de *P. capsici* mediante el uso de suspensión celular de *Bacillus* spp.**

El bioensayo de inhibición germinativa se llevó a cabo en portaobjetos cóncavos. Para inducir la formación de esporangios de *P. capsici*, se tomaron discos de 5 mm de agar con micelio del patógeno con 5 días de crecimiento, éstos se colocaron en cajas Petri con 10 mL de agua destilada e incubada a 25-27°C por 48 h. Para la liberación de zoosporas del esporangio, las cajas Petri se incubaron a 4°C por 30 min (Ko *et al.*, 2010), logrando una concentración de 20 zoosporas/ $\mu$ L. Se colocaron 20  $\mu$ L de suspensión de zoosporas en cada concavidad del portaobjeto, se añadió 20  $\mu$ L de suspensión celular bacteriana de los aislados B17 y B32 a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC 1:1 v/v, se cubrió con un cubreobjetos para prevenir la evaporación, y se incubó por 24 h a 25-27°C (Ko *et al.*, 2010). Las zoosporas que no fueron inoculadas con la suspensión celular bacteriana se utilizaron como testigo. El porcentaje de inhibición germinativa de zoosporas, para los bioensayos con suspensión celular y filtrados bacterianos, se registró al contabilizar la germinación de 100 zoosporas en cada concavidad con la ayuda de un microscopio óptico (Carl Zeiss AXIO Imager.A2), con cámara integrada (AxioCam ERc5s) con los objetivos 10x y 40x. Cada tratamiento contó con siete repeticiones y el experimento se realizó por duplicado.

### **Inhibición germinativa de zoosporas mediante el uso de filtrado bacteriano**

El filtrado bacteriano se obtuvo al colocar en un matraz Erlenmeyer, 50 mL de caldo nutritivo con 200  $\mu$ L de una suspensión de esporas de los aislados bacterianos B17 y B32 con una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC. Los matraces se incubaron a 30°C

from each concavity were counted using an optical microscope (Carl Zeiss AXIO Imager.A2) with an integrated camera (AxioCam ERc5s) and 10x and 40x objectives. Each treatment had seven replications and the experiment was conducted in duplicate.

### **Inhibition of zoospore germination using bacterial filtrates**

The bacterial filtrate was made by placing in an Erlenmeyer flask 50 mL of nutrient broth and 200  $\mu$ L of spore suspension of the B17 and B32 bacterial isolates at a concentration of  $1 \times 10^8$  UFC. The flasks were incubated at 30°C in an orbital shaker (140 rpm) for 6 days. The cultures were filtered using 0.22  $\mu$ m Millipore® filters to remove bacterial cells (Chen *et al.*, 2016b). To inhibit germination, 20  $\mu$ L of the zoospore suspension (20 zoospores/ $\mu$ L), mixed with 20  $\mu$ L of bacterial filtrate (1:1 v/v), were placed in the slide cavity, covered with a slide to prevent evaporation and then incubated at 25-27°C for 24 h (Ko *et al.*, 2010). Zoospores without bacterial filtrate were used as a control.

### **Antagonism of *Bacillus* spp. against *P. capsici* in vivo using cell suspension and bacterial filtrates in tomato and chili plants**

For the present study we used Malinche hybrid tomato seedlings and SV3198HJL hybrid chili seedlings 3 three weeks after germination. The *P. capsici* pathogen was inoculated directly into the root of both crops using 1 mL of the zoospore suspension ( $1 \times 10^3$ /mL) on both crops, followed by inoculation with 10 mL of the bacterial cell suspension ( $1 \times 10^8$ /mL) or their filtrates. All the treatments were applied under the same conditions.

The level of disease severity or damage was measured based on a scale for root neck rot

en un agitador orbital (140 rpm) por 6 días. Los cultivos se filtraron utilizando filtros Millipore® de 0.22 µm para eliminar las células bacterianas (Chen *et al.*, 2016b). Para la inhibición de la germinación, se colocaron 20 µL de suspensión de zoosporas (20 zoosporas/µL) en la cavidad del portaobjeto, mezclado con 20 µL del filtrado bacteriano (1:1 v/v), se cubrieron con cubreobjetos para prevenir la evaporación y se incubaron por 24 h a 25-27 °C (Ko *et al.*, 2010). Las zoosporas sin filtrado bacteriano se utilizaron como testigo.

### **Antagonismo de *Bacillus* spp. sobre *P. capsici* *in vivo*, con el uso de suspensión celular y filtrados bacterianos en plantas de tomate y chile.**

Las plántulas que se utilizaron para este estudio fueron, de tomate híbrido Malinche y de chile híbrido SV3198HJ con 3 semanas de desarrollo después de la germinación. La inoculación del patógeno *P. capsici* fue directa a la raíz, se colocó 1 mL de suspensión de zoosporas (1 x 10<sup>3</sup>/mL) para ambos cultivos, en seguida fueron inoculadas con 10 mL de suspensión de células bacterianas (1 x 10<sup>8</sup>/mL) o sus filtrados, las condiciones fueron las mismas para todos los tratamientos.

La severidad del daño o enfermedad se midió de acuerdo a una escala de síntomas de pudrición del cuello de raíz propuesta por Segarra *et al.* (2013) con la modificación de: 0 indica planta sin síntomas, 1 = síntomas de daños < 10 mm, 2 = 10 a 19 mm de pudrición, 3 = 20 a 30 mm de pudrición y 4 = > de 30 mm de pudrición. El porcentaje de la severidad del daño se calculó mediante la fórmula:  $\%SD = \sum \left[ \frac{GD \times NP}{EM \times TP} \right] \times 100$  donde:

symptoms that was proposed by Segarra *et al.* (2013) and modified as follows: 0 = symptomless plants, 1 = damage symptoms < 10 mm, 2 = 10-19 mm rotted, 3 = 20-30 mm rotted, and 4 = > 30 mm rotted. The percentage of damage severity was calculated using the following formula:  $\%SD = \sum \left[ \frac{GD \times NP}{EM \times TP} \right] \times 100$  where % DS= percentage of damage severity; GD= level of damage; NP= number of damaged plants; EM= maximum level of damage on the severity scale; and TP= number of plants included in the treatment (Shanmugam and Kanoujia, 2011; Li *et al.*, 2012). The control effectiveness was calculated using the following formula:  $\%EC = \frac{100 - SD \text{ del tratamiento}}{SD \text{ del control}} \times 100$  where % EC = percentage of the control effectiveness; treatment SD = average damage severity per treatment; control SD = average damage severity on the control (Li *et al.*, 2012). The experiment included three replications per treatment and was conducted in duplicate in the glasshouse. We used a pot with three seedlings as the experiment unit. This study was conducted on two different dates, and the analyzed data were reported as evaluation averages.

### **Statistical analyses**

A completely randomized design was used in both bioassays, *in vitro* and *in vivo* and the data obtained were analyzed using a variance analysis (ANOVA) and the Minitab 17 statistical program. We used Tukey's test (p≤0.05) to compare the means.

%SD= porcentaje de severidad de daño, GD= grado de daño, NP= número de plantas dañadas, EM= grado de daño máximo de la escala de severidad y TP= número de plantas del tratamiento (Shanmugam y Kanoujia, 2011; Li *et al.*, 2012) y la eficacia de control se calculó utilizando la fórmula: 
$$\%EC = \frac{100 - SD \text{ del tratamiento}}{SD \text{ del control}} \times 100$$
 donde % EC = porcentaje de eficacia de control, SD del tratamiento = media de severidad de daño por tratamiento, SD del control = media de severidad de daño del control (Li *et al.*, 2012); el experimento consistió en tres repeticiones por tratamiento bajo invernadero por duplicado. La unidad experimental fue una maceta con tres plántulas. Este estudio se realizó en dos fechas diferentes, los datos analizados se reportaron como promedios de las evaluaciones.

### Análisis estadísticos

Para ambos bioensayos *in vitro* e *in vivo* se utilizó un diseño completamente al azar, y los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con en el programa estadístico Minitab 17; así mismo, la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Identificación morfológica

Las colonias bacterianas de B17 y B32, mostraron características similares en cuanto a su forma y color. Las colonias del aislado B17 presentan una elevación en el centro (acuminada) con una consistencia cremosa y mucoide a diferencia del aislado B32, las cuales se observan planas y de consistencia seca y grumosa.

## RESULTS

### Morphological identification

The bacterial colonies of B17 and B32 were similar in shape and color. The colonies of the B17 isolate showed a mound of creamy and mucoid consistency (acuminate) in the middle compared to those of the B32 isolate, which were flat and of dry and lumpy consistency.

Both isolates were Gram positive and developed peritrichous flagella. Cells of the B17 isolate were between 2.0 and 3.2  $\mu\text{m}$  long., while the cells of the B32 isolate were between 3.0 and 4.5  $\mu\text{m}$  long. The latter also developed parasporal crystals (Cry protein), which are similar to the most important features of the bacteria of the *Bacillus* genus, which are bacillar in shape, 0.5-2.5 and 1.2-10  $\mu\text{m}$  in cell size, Gram positive to stain and move through flagella inserted peritrichously.

### Molecular identification

The PCR sequences of the B17 and B32 isolates were 99% to 100% identical to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus thuringiensis*, respectively, when compared to the sequences already reported in the Gen Bank database (NCBI). The sequences were included in the database with Access number KX953161.1 for B17 and KX953162.1 for B32.

### Inhibition of *P. capsici* zoospore germination using a *Bacillus* spp. cell suspension

The results show that both bacteria inhibit zoospore germination and deform the germinative tube after 24 h (Figures 1 and 2). In the control

Ambos aislados resultaron Gram positivos y flagelos peritricos. Las medidas celulares del aislado B17 oscilaron entre 2.0 a 3.2  $\mu\text{m}$  de longitud; a su vez, el tamaño celular del aislado B32 fue de 3.0 a 4.5  $\mu\text{m}$ ; además, en este aislado se observó la presencia de cristales parasporales (proteína Cry), coincidiendo con las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, las cuales son de forma bacilar, movilidad por flagelos insertados en forma peritrica, tamaño celular de 0.5-2.5 y 1.2-10  $\mu\text{m}$  y tinción Gram positivas.

### Identificación molecular

Las secuencias obtenidas mediante la técnica molecular de PCR de los aislados B17 y B32, mostraron una identidad del 99 al 100% con *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus thuringiensis* respectivamente al ser comparadas con secuencias ya reportadas en la base de datos del Gen Bank (NCBI); las secuencias fueron depositadas en la base de datos donde se les asignó el No. de acceso KX953161.1 para la cepa B17 y KX953162.1 para B32.

### Inhibición germinativa de zoosporas de *P. capsici* mediante el uso de suspensión celular de *Bacillus* spp.

Los resultados muestran que ambas bacterias inhiben la germinación de zoosporas; así como, deformación en el tubo germinativo después de 24 h (Figuras 1 y 2). En los tratamientos testigo, las zoosporas a las 24 h después de ser liberadas del esporangio presentaron un 100% de germinación. La cepa de *B. amyloliquefaciens* causó 88.15% de inhibición germinativa; mientras que, la cepa *B. thuringiensis* fue más efectiva al causar un 97.05% de inhibición (Cuadro 1).

treatments, 24 h after being released from the sporangium, zoospores showed 100% germination. The *B. amyloliquefaciens* isolate caused 88.15% germinative inhibition, but the *B. thuringiensis* isolate was more effective and caused 97.05% inhibition (Table 1).

### Inhibition of *P. capsici* zoospore germination using *Bacillus* spp. filtrates

*Bacillus amyloliquefaciens* bacterial filtrates inhibited 24.3% of *P. capsici* zoospore germination *in vitro*, while *B. thuringiensis* filtrates produced 49.35% inhibition. The control showed 100% germination (Table 1).

### Severity of damage caused by *P. capsici* using cell suspension and bacterial filtrates in tomato and chili plants.

The results indicate that in plants treated with a *B. thuringiensis* cell suspension, the disease incidence was 38.89% in chili and 22.22% in tomato plants, while in plants treated with a *B. amyloliquefaciens* cell suspension, the incidence was 61.11% in chili and 27.78% in tomato. When the plants were inoculated with filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*, the level of severity of neck rot symptoms was greater than 90% and 70% in chili plants and 60% and 40% in tomato plants, respectively (Table 2).

### Biological effectiveness of *Bacillus* spp. on *P. capsici* using cell suspension and bacterial filtrates in tomato and chili plants.

The obtained results show that in chili and tomato plants inoculated with a cell suspension of



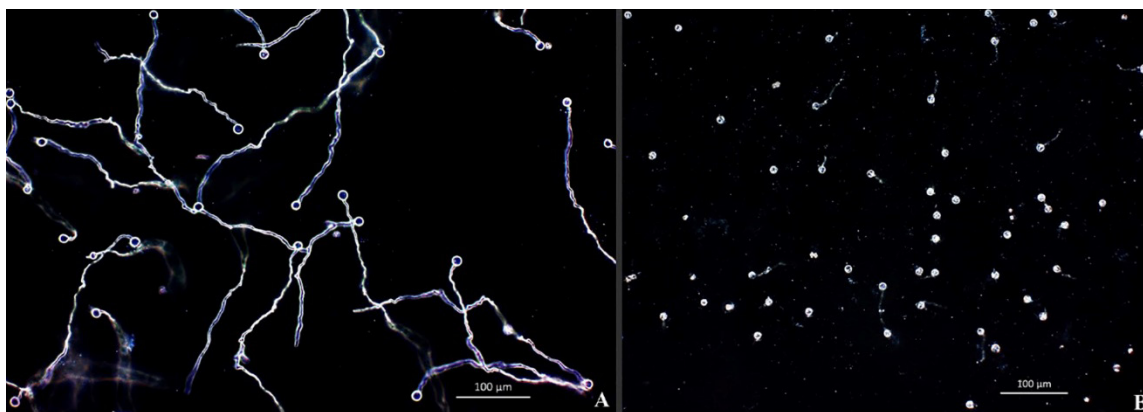


Figura 1. Efecto de la suspensión celular o filtrado de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* en la inhibición germinativa de zoosporas de (*P. capsici*) 24 h post-inoculación. (A) germinación de zoosporas sin tratamiento utilizado como control. (B) inhibición germinativa con tratamiento. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio con objetivo (10x) en campo oscuro.

Figure 1. Effect of the cell suspension and filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* on *P. capsici* zoospores germination inhibition 24 h after inoculation. (A) zoospores germination without the treatment used as a control. (B) germination inhibition with the treatment. The photographs were taken under a darkfield microscope with objective (10x).

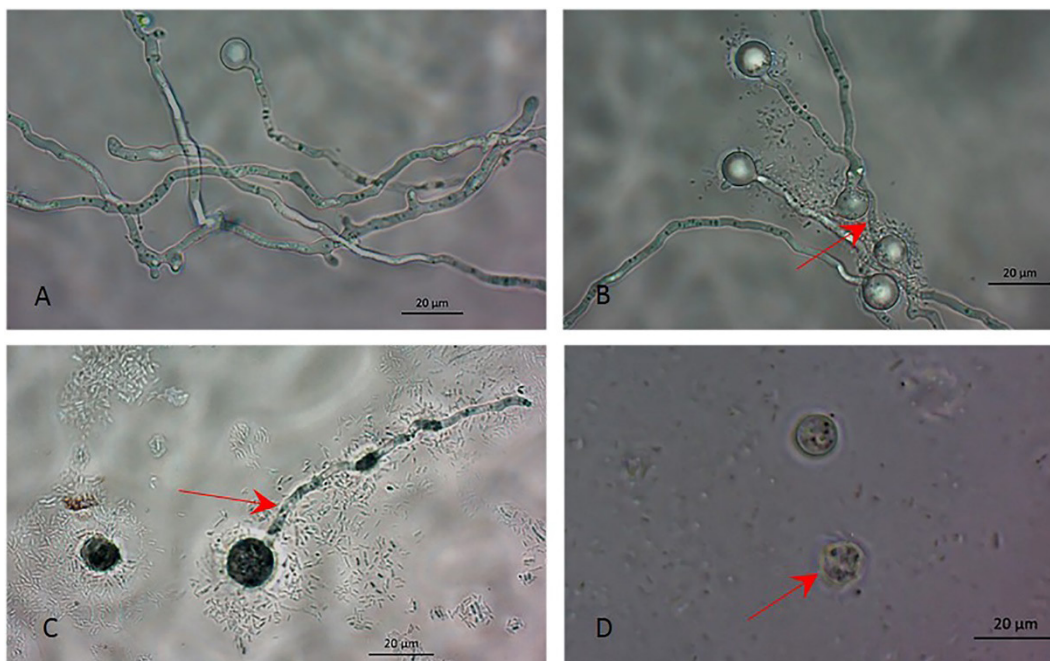


Figura 2. La morfología de la zoospora de *P. capsici* germinada con y sin tratamiento bacteriano (suspensión celular o filtrados) de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. (A) Zoospora germinada sin inoculación. (B y C) tubo germinativo anormal y zoosporas sin germinación y (D) las paredes de la zoospora de *P. capsici* se lisaron cuando fueron tratadas con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio con objetivo (40x) en campo claro.

Figure 2. Morphology of a *P. capsici* germinated zoospore with and without *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* bacterial treatment (cell suspension or filtrates). (A) Germinated zoospore without inoculation. (B y C) Unusual germinative tube and non-germinated zoospores, and (D) *P. capsici* zoospore cells became bare when treated with *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension. The photographs were taken under a bright-field microscope with objective (40x).

### Inhibición germinativa de zoosporas de *P. capsici* mediante el uso de filtrado de *Bacillus* spp.

Los filtrados bacterianos de *B. amyloliquefaciens* inhibieron la germinación de zoosporas de *P. capsici* a nivel *in vitro* 24.3%; mientras que con los filtrados de *B. thuringiensis* se obtuvo 49.35% de inhibición. En el testigo se observó el 100% de germinación (Cuadro 1).

### Severidad de daño causada por *P. capsici* con el uso de suspensión celular y filtrados bacterianos en plantas de tomate y chile.

Los resultados indican que las plantas tratadas con suspensión celular de *B. thuringiensis*, presentan una incidencia de la enfermedad en ambos cultivos de 38.89% en plantas de chile y 22.22% en tomate; mientras que, las plantas tratadas con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens*, se observa 61.11% de incidencia de la enfermedad en plantas de chile y 27.78% en tomate. Cuando las plantas fueron inoculadas con filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, la severidad de los síntomas de la pudrición del cuello fue mayor 90 y 70% en plantas de chile y 60 y 40% en plantas de tomate respectivamente (Cuadro 2).

### Eficacia biológica de *Bacillus* spp. sobre *P. capsici*, con el uso de suspensión celular y filtrados bacterianos en plantas de tomate y chile.

En los resultado obtenidos se observa que en las plantas que fueron inoculadas con suspensión celular de *B. thuringiensis*, se obtuvo una eficacia de biocontrol mayor al 60 y 77% en plantas de chile y tomate respectivamente; mientras que, en las plantas de chile y tomate tratadas con filtrados bacterianos se observó una eficacia menor al 28 y 56% respectivamente (Cuadro 3). La suspensión celular

**Cuadro 1. Inhibición de germinación de las zoosporas (*P. capsici*) mediante el uso de suspensión celular y filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, 24 h después de la inoculación.**

**Table 1. Inhibition of (*P. capsici*) zoospores germination using *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension and filtrates 24 h after inoculation.**

| Tratamientos                | % de inhibición de la germinación <sup>x</sup> + DE |               |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|
|                             | Suspensión Cel.                                     | Filtrados     |
| Control (Agua)              | 0.00 a <sup>y</sup>                                 | 0.00 a        |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | 88.15±2.519 b                                       | 24.30±6.280 b |
| <i>B. thuringiensis</i>     | 97.05±1.191 c                                       | 49.35±5.031 c |

<sup>x</sup>Las medias con letras distintas son significativamente diferentes (ANDEVA), de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) / <sup>y</sup>Means with different letters are significantly different (ANOVA), according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup>Inhibición germinativa = (Número de zoosporas germinadas/Total de zoosporas) x 100 (Chen *et al.*, 2016b). DE = Desviación estándar / <sup>z</sup>Germination inhibition = (Number of germinated zoospores/Total of zoospores) x 100 (Chen *et al.*, 2016b). SD= Standard deviation.

*B. thuringiensis*, the efficacy of the biocontrol was higher than 60 and 77%, respectively, while in the plants treated with bacterial filtrates, the efficacy was lower than 28 and 56%, respectively (Table 3). The biocontrol efficacy of the cell suspension of *B. amyloliquefaciens* in chili was only 38.89%, while in tomato it was significantly higher, more than 72%. However, the biocontrol efficacy of its bacterial filtrates was lower than 6 and 38% in chili and tomato plants, respectively (Table 3, Figure 3).

## DISCUSSION

The disease caused by *P. capsici* is very important because it affects economically important crops such as tomato and chili (Agrios, 2005; Hansen *et al.*, 2012). Considering this situation, and because chemical control and most crop management practices are not efficient tools to

**Cuadro 3. Eficacia biológica de la suspensión celular y filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* sobre *P. capsici* en plántulas de chile y tomate.**

**Table 3. Biological effectiveness of the suspension and filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* on *P. capsici* in chili and tomato seedlings.**

| Tratamiento                                              | Eficacia biológica (%) <sup>x</sup> +DE |              |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------|
|                                                          | Chile                                   | Tomate       |
| <i>P. capsici</i>                                        | 0 c <sup>y</sup>                        | 0 d          |
| S. Cel. <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>P. capsici</i>  | 38.89±3.61 b                            | 72.25±2.20 a |
| S. Cel. <i>B. thuringiensis</i> - <i>P. capsici</i>      | 61.11±5.03 a                            | 77.78±0.00 a |
| Filtrado <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>P. capsici</i> | 5.56±7.78 c                             | 38.89±3.61 c |
| Filtrado <i>B. thuringiensis</i> - <i>P. capsici</i>     | 27.78±3.38 b                            | 55.56±0.00 b |

<sup>x</sup>Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (ANDEVA), de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) / <sup>y</sup>Means that do not share a letter are significantly different (ANOVA), according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup>Eficacia de control = (100 - media de severidad de daño por tratamiento)/(media de severidad de daño del control) x 100 (Li *et al.*, 2012). DE = Desviación estándar / <sup>y</sup>Effectiveness of the control = (100 - average severity of damage per treatment)/(average severity of damage from the control) x 100 (Li *et al.*, 2012). SD= Standard deviation.

de *B. amyloliquefaciens* mostró una eficacia de biocontrol en plantas de chile tan solo de 38.89%; mientras que, en tomate fue significativa con más del 72%; sin embargo, la eficacia de biocontrol de

reduce the damage caused by *P. capsici* in tomato and chili seedlings, the use of biocontrol organisms could be a promising alternative (Bae *et al.*, 2016; Thampi and Bhai, 2017).

**Cuadro 2. Severidad de daño por *P. capsici* en plántulas de chile y tomate tratadas con suspensión celular y filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* después de 7 d de inoculación.**

**Table 2. Table 2. Severity of damage caused by *P. capsici* in chili and tomato seedlings treated with *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension and filtrates 7 d after inoculation.**

| Tratamiento                                     | Severidad de daño (%) <sup>x</sup> +DE |               |               |              |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------|---------------|--------------|
|                                                 | Chile                                  |               | Tomate        |              |
|                                                 | S. celular                             | Filtrado      | S. celular    | Filtrado     |
| Control (Agua)                                  | 0.00 c <sup>y</sup>                    | 0.00 c        | 0.00 c        | 0.00 c       |
| <i>P. capsici</i>                               | 100 a                                  | 100 a         | 100 a         | 100 a        |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>P. capsici</i> | 61.11±6.49 b                           | 94.44±2.26 ab | 27.78±4.18 b  | 61.11±4.18 b |
| <i>B. thuringiensis</i> - <i>P. capsici</i>     | 38.89±4.18 b                           | 72.25±4.18 b  | 22.22±2.87 bc | 44.44±4.54 b |

<sup>x</sup>Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (ANDEVA), de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) / <sup>y</sup>Means that do not share a letter are significantly different (ANOVA), according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup>Severidad de daño =  $[\Sigma (\text{grado de daño} \times \text{número de plantas dañadas}) / (\text{grado de daño máximo de la escala de severidad} \times \text{total de plantas del tratamiento})] \times 100$ . DE = Desviación estándar / <sup>y</sup>Severity of damage =  $[\Sigma (\text{extent of damage} \times \text{number of damaged plants}) / (\text{extent of maximum damage in the severity scale} \times \text{total of plants from the treatment})] \times 100$ . SD= Standard deviation.



sus filtrados bacterianos estuvo por debajo de 6 y 38% en plantas de chile y tomate respectivamente (Cuadro 3, Figura 3).

## DISCUSIÓN

La enfermedad producida por *P. capsici* es muy importante debido a que afecta a cultivos de importancia económica como tomate y chile (Agrios 2005; Hansen *et al.*, 2012). Tomando en cuenta esta situación, y a que el control químico y la mayoría de las prácticas culturales no representan herramientas efectivas para disminuir la incidencia de daño por este patógeno en plántulas de tomate y chile, el uso de organismos de biocontrol pueden ser una alternativa promisoriosa (Bae *et al.*, 2016; Thampi y Bhai, 2017).

Since the microorganisms of the *Bacillus* genus are found mainly in the soil, in this study we used two bacterial isolates whose morphological traits belong to that genus. Using molecular techniques, the B17 isolate was identified as *B. amyloliquefaciens*, and isolate B32 was in alignment with *B. thuringiensis* and *B. cereus*. However, different authors, such as Sánchez *et al.* (2016), mention that one of the main differences between *B. thuringiensis* and *B. cereus* is that they produce parasporal crystals (Cry protein), a characteristic of *B. thuringiensis* observed in the B32 isolate.

It was also demonstrated that they show the effect of biocontrol and *P. capsici* zoospore germination inhibition in tomato and chili seedlings, because *P. capsici* zoospore germination inhibition *in vitro* was  $88.15 \pm 2.5$  and  $97.05 \pm 1.19\%$  when we used cell suspensions of *B. amyloliquefaciens*



**Figura 3.** Eficacia de control de la enfermedad ocasionada por *P. capsici* en plántulas de chile y tomate mediante el uso de suspensión celular o filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. Las plántulas fueron inoculadas con 1  $\mu\text{L}$  de zoosporas  $1 \times 10^3$  y 10  $\mu\text{L}$  de suspensión celular o filtrado. (A) daño por *P. capsici* en plántulas de chile, (B) plántulas de chile con *P. capsici*+suspensión celular de *B. thuringiensis*, (C) daño por *P. capsici* en tomate y (D) plántulas de tomate con *P. capsici*+suspensión celular de *B. thuringiensis*.

**Figure 3.** Effectiveness to control the disease caused by *P. capsici* in chili and tomato seedlings using *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension or filtrate. The seedlings were inoculated with 1  $\mu\text{L}$  of  $1 \times 10^3$  zoospores and 10  $\mu\text{L}$  of cell suspension or filtrate. (A) damage caused by *P. capsici* in chili seedlings, (B) chili seedlings with *P. capsici*+cell suspension of *B. thuringiensis*, (C) damage caused by *P. capsici* in tomato, and (D) tomato seedlings using *P. capsici*+cell suspension of *B. thuringiensis*.



Los microorganismos del género *Bacillus* se encuentra principalmente en suelo, en este estudio se trabajó con dos aislados bacterianos, cuyas características morfológicas pertenecen al género *Bacillus*. Estos fueron identificados mediante técnicas moleculares el aislado B17 como *B. amyloliquefaciens* y B32 mostró un alineamiento con *B. thuringiensis* y *B. cereus*; sin embargo, de acuerdo a diversos autores tal como Sánchez *et al.*, 2016, mencionan que una de las principales diferencias entre *B. thuringiensis* y *B. cereus*, es la producción del cristal parasporal (proteína cry), característico de *B. thuringiensis*; en la que se observó en nuestro aislado B32.

Así mismo, se demostró que presentan efecto de biocontrol e inhibición de la germinación de zoosporas de *P. capsici* en plántulas de tomate y chile al observar que la inhibición de la germinación de zoosporas de *P. capsici* a nivel *in vitro* fue del  $88.15 \pm 2.5$  y  $97.05 \pm 1.19\%$  al utilizar suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, respectivamente. Torres *et al.* (2016) reportaron una inhibición del  $56.5 \pm 2.1\%$  sobre el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina* mediante la técnica de cultivo dual, utilizando suspensión celular de *B. amyloliquefaciens*. De acuerdo con lo observado en el trabajo de Torres *et al.* (2016) y en el presente trabajo, se demuestra que la capacidad biocontroladora de *B. amyloliquefaciens* se ve afectada por la naturaleza del patógeno, ya que al confrontar la suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* con zoosporas de *P. capsici* en medio de cultivo líquido, se observa una inhibición germinativa del 88.15%. Por otro lado, Chen *et al.* (2016b), reportaron una tasa de germinación de zoosporas de *P. capsici* del 100% al ser confrontadas con filtrados obtenidos de un cultivo de *Streptomyces plicatus*, donde los ingredientes del medio de cultivo fueron papa y sucrosa; sin embargo, los resultados que obtuvieron al utilizar filtrados provenientes de medios de cultivo

and *B. thuringiensis*, respectively. Torres *et al.* (2016) reported  $56.5 \pm 2.1\%$  inhibition of *Macrophomina phaseolina* mycelial growth using the dual crop technique and cell suspension of *B. amyloliquefaciens*. According to Torres *et al.* (2016) and to the present study, it has been proven that *B. amyloliquefaciens* biocontrol capacity is affected by the pathogen's nature, because when the cell suspension of *B. amyloliquefaciens* was mixed with *P. capsici* zoospores in a liquid culture medium, it caused 88.15% germination inhibition. On the other hand, Chen *et al.* (2016b) reported 100% *P. capsici* zoospore germination when they were mixed with filtrates from a *Streptomyces plicatus* culture whose ingredients were potato and sucrose. However, the results obtained using filtrates from a culture medium containing chitin, potato and sucrose show 100% zoospore germination, a fact that indicates that biocontrol agents are more effective when the pathogen to be controlled is present than under conditions that do not threaten its development. This was demonstrated by using bacterial filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* on a suspension of *P. capsici* zoospores, where  $24.30 \pm 6.28$  and  $49.35 \pm 5.03\%$  germination inhibition was observed, respectively, which is lower than that observed when a cell suspension was used.

While conducting *in vivo* experiments using cell suspensions of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*, damage severity was  $61.11 \pm 6.49$  and  $38.89 \pm 4.18\%$ , respectively, while the control showed 100% damage. Several *Bacillus* species are promising as part of the biocontrol strategy given their ability to produce a variety of antibacterial and antifungal metabolites (Zhi *et al.*, 2017). Due to their versatile ability to produce bioactive compounds, different *Bacillus* species are being studied in order to use them in several applications (Torres *et al.*, 2017). For example, many *Bacillus* isolates produce

que contenían quitina, papa y sucrosa, alcanzaron una inhibición de la germinación de zoosporas del 100%, lo que demuestra que los agentes de biocontrol son más eficientes en presencia del patógeno a controlar, que si se encuentran en condiciones que no amenacen su desarrollo. Esto se demostró al utilizar filtrados bacterianos de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, sobre una suspensión de zoosporas de *P. capsici*, donde se observó una inhibición de la germinación de  $24.30 \pm 6.28$  y  $49.35 \pm 5.03\%$  respectivamente, mucho menor a la que se observó al utilizar la suspensión celular.

Durante los experimentos *in vivo*, se observó una severidad de daño del  $61.11 \pm 6.49$  y  $38.89 \pm 4.18\%$  al utilizar suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* respectivamente, mientras que el control presentó el 100% de daño. Algunas especies de *Bacillus* son promisorias dentro del biocontrol, debido a su capacidad de producir una variedad de metabolitos antibacterianos y antifúngicos (Zhi *et al.*, 2017). Debido a su versatilidad como productores de compuestos bioactivos, se están estudiando diferentes especies de *Bacillus* para varias aplicaciones potenciales (Torres *et al.*, 2017). Por ejemplo, muchas cepas de *Bacillus* producen una variedad de lipopéptidos cíclicos antifúngicos (CLP), incluyendo miembros de las familias surfactina, iturina y fengicina (Torres *et al.*, 2016). Se ha demostrado que los lipopéptidos pertenecientes a las familias iturina, fengicina y surfactina son los compuestos más importantes en la actividad de biocontrol de cepas de *Bacillus* contra diferentes hongos fitopatógenos de diferentes especies de plantas (Masmoudi *et al.*, 2017; Abdallah *et al.*, 2017). Por lo tanto, el control de las enfermedades fúngicas por los *Bacillus*, representaría una oportunidad relevante para la biotecnología agrícola.

Varios autores han reportado a *B. amyloliquefaciens* como una alternativa de biocontrol para diferentes patógenos (Yu y Lee., 2013; Wei *et al.*, 2015;

several antifungal cyclic lipopeptides (CLPs), including members of the surfactin, iturine and fengycin families (Torres *et al.*, 2016). It has been demonstrated that lipopeptides belonging to the iturine, fengycin and surfactin families, are the most important compounds in the biocontrol activity of *Bacillus* isolates against different phytopathogenic fungi in different plant species (Masmoudi *et al.*, 2017; Abdallah *et al.*, 2017). Therefore, using *Bacillus* to control fungal diseases would be a great opportunity for agricultural biotechnology.

Several authors have reported *B. amyloliquefaciens* as a biocontrol option for different pathogens (Yu and Lee., 2013; Wei *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016b; Abdallah *et al.*, 2017). However, there are no reports on *P. capsici* control of tomato and chili in which *B. amyloliquefaciens* shows effective biocontrol; therefore, based on the results obtained in the present study, more research on this microorganism must be conducted. *Bacillus thuringiensis* has also proven to be efficient mainly for controlling insects in different crops and fruits after harvest (Zheng *et al.*, 2013; Deepak and Jayapradha 2015; Kim *et al.*, 2017). Mojica-Marín *et al.* (2009) reported they controlled chili wilting using *B. thuringiensis*, but their study was directly conducted on germination of seeds inoculated with *P. capsici*, where 62 to 93% germination was observed on treated seeds. However, information on the use of *B. thuringiensis* for controlling *P. capsici* in tomato and chili seedlings is almost nil.

## CONCLUSIONS

The cell suspensions of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* species produced significantly higher inhibition than their filtrates on *P. capsici* zoospores. They also showed biological control

Zhang *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016b; Abdallah *et al.*, 2017); sin embargo, para el biocontrol de *P. capsici* en cultivos de tomate y chile no existen reportes donde *B. amyloliquefaciens* presente un biocontrol efectivo, por lo que, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, es necesario más investigación con este microorganismo. Así mismo, *B. thuringiensis* ha demostrado ser eficiente principalmente en el control de insectos, en distintos cultivos y frutos poscosecha (Zheng *et al.*, 2013; Deepak y Jayapradha 2015; Kim *et al.*, 2017). Mojica-Marín *et al.* (2009) reportaron el biocontrol de la marchitez del chile mediante el uso de *B. thuringiensis*, solo que el trabajo se realizó directamente en la germinación de semillas inoculadas con *P. capsici*, donde se observó una germinación entre 62 y 93% de las semillas tratadas; sin embargo, la información es casi nula con respecto al uso de *B. thuringiensis* en el biocontrol de *P. capsici* en plántulas de tomate y chile.

## CONCLUSIONES

La suspensión celular de las especies *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* causaron una inhibición significativamente mayor que sus filtrados sobre las zoosporas de *P. capsici*. Así mismo, presentaron potencial de control biológico en cultivos de tomate y chile contra *P. capsici*. Lo que sugiere la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica. Por lo que estos microorganismos pueden ser usados como agentes de biocontrol de *P. capsici* en plantas de tomate y chile. Por lo tanto, se requieren de más estudios en la identificación de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos, producidos por estas bacterias y evaluar su capacidad antifúngica.

potential in tomato and chili crops against *P. capsici*. This result suggests that these microorganisms produce secondary metabolites that have biological activity and can thus be used as *P. capsici* biocontrol agents in tomato and chili plants. Therefore, more studies are required to identify secondary metabolites or bioactive compounds produced by these bacteria, as well as to assess their antifungal capacity.

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

LITERATURA CITADA

- Abdallah RAB, Stedel C, Garagounis C, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddine H, Papadopoulou KK and Daami-Remadi M. 2017. Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection* 99:45-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.008>
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier. Academic Press. USA. Pp. 305-592.
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-40. Disponible línea: <https://www.biostat.wisc.edu/bmi576/papers/blast.pdf>
- Bae SJ, Mohanta TK, Chung JY, Ryu M, Park G, Shim S, Hong SB, Seo H, Bae DW, Bae I, Kim JJ and Bae H. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control* 92:128-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
- Castillo C, Sosa B y Scorza J. 2004. Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [online]. Vol.24, n.1-2 [citado 2017-09-14], pp. 65-67. Disponible en línea: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100011&lng=es&tlng=es
- Chen JT, Su HJ and Huang JW. 2012. Isolation and identification of secondary metabolites of *Clitocybe nuda* responsible for inhibition of zoospore germination of *Phytophthora capsici*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:7341-7344. <http://dx.doi.org/10.1021/jf301570y>
- Chen X, Zhang Y, Fu X, Li Y and Wang Q. 2016 a. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology* 115:113-121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>

- Chen YY, Chen PCh and Tsay TT. 2016 b. The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. Biological Control 98:34-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
- Deepak R and Jayapradha R. 2015. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak 2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. Journal de Mycologie Médicale 25:15-24. <https://doi.org/10.1016/j.myc-med.2014.10.011>
- Erwin D and Ribeiro O. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota. The American Phytopathological Society. 562 p.
- González ChMM, Villordo PE, Pons HJL, Delgadillo SF, Paredes MR, Godoy HH, Anaya LJJ, Gámez VFP, Medina CT, Rodríguez GR, Ruiz CE, Ruiz LA, Cárdenas BR, Cárdenas AJR, Torres PI, Rendón PE, Martínez SJ, Mojarro DF, Villaseñor EOM y Guerrero ABZ. 2009. Guía para el manejo de la marchitez del chile en Guanajuato. Primera Edición. Prometeo Editores, S. A. de C. V. CEPROCH-Guanajuato. México, D. F. 34 pp.
- Gómez RO, Corona TT and Aguilar RVH. 2017. Differential response of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes. Crop Protection 92:148-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.023>
- Hansen EM, Reeser PW and Sutton W. 2012. *Phytophthora* beyond agriculture. Annual Review of Phytopathology 50:359-378. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172946>
- Hausbeck MK and Lamour KH. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. Plant Disease 88:1292-1303. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1292>
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H and Nardon P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and Wolbachia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:6814-6819. Disponible en línea: <http://www.pnas.org/content/96/12/6814.full>
- Kang SW and Kim SW. 2004. New antifungal activity of *Penicillium* acid against *Phytophthora* species. Biotechnology Letters 26:695-698. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000024090.96693.a4>
- Khan MA, Cheng Z, Xiao X, Khan AR and Ahmed SS. 2011. Ultrastructural studies of the inhibition effect against *Phytophthora capsici* of root exudates collected from two garlic cultivars along with their qualitative analysis. Crop Protection 30:1149-1155. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.04.013>
- Kim HS, Noh S and Park Y. 2017. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ac and Cry1 Ca toxicity against *Spo-doptera exigua* (Hubner) by suppression of a chitin synthase B gene in midgut. Journal of Asia-Pacific Entomology 20:199-205. DOI: 10.1016/j.aspen. 2016.12.015
- Ko WH, Tsou YJ, Lin MJ and Chern LL. 2010. Activity and characterization of secondary metabolites produced by a new microorganism for control of plant diseases. New Biotechnology 27:397-402. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.05.014
- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. Molecular Plant Pathology 13:329-337. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- Li CH, Shi L, Han Q, Hu HL, Zhao MW, Tang CM and Li SP. 2012. Biocontrol of *verticillium* wilt and colonization of cotton plants by an endophytic bacterial isolate. Journal of Applied Microbiology 113:641-651. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05371.x
- Masmoudi F, Khedher SB, Kamoun A, Zouari N, Tounsi S and Trigui M. 2017. Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amylo-liquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. Microbiological Research. 197:29-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.001>
- McLaughlin RW, Chen M, Zheng J and Wang D. 2012. Analysis of the bacterial diversity in the fecal material of the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*. Molecular Biology Reports 39(5):5669-5676. DOI: 10.1007/s11033-011-1375-0
- Mojica-Marín V, Luna-Olvera HA, Sandoval-Coronado CF, Pereyra-Aferez B, Mrales-Ramos LH, Gonzalez-Aguilar NA, Hernandez-Luna CE y Alvarado-Gomez OG. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. Revista Internacional de Botánica Experimental 78:105-110. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v78n2/v78n2a04.pdf>
- Naing KW, Anees M, Nguyen XH, Lee YS, Jeon SW, Kim SJ, Kim MH and Kim KY. 2014. Biocontrol of late blight disease (*Phytophthora capsici*) of pepper and the plant growth promotion by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. Journal of Phytopathology 162:367-376. DOI: 10.1111/jph.12198
- Nguyen XH, Naing KW, Lee YS, Tindwa H, Lee GH, Jeong BK, Ro HM, Kim SJ, Jung WJ and Kim KY. 2012. Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper. The Plant Pathology Journal 28(3):282-289. DOI: 10.5423/PPJ.OA.03.2012.0040
- Pal KK and Gardener BM. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Qi R, Wang T, Zhao W, Li P, Ding J and Gao Z. 2012. Activity of ten fungicides against *Phytophthora capsici* isolates resistant to Metalaxyl. Journal Phytopathology 160:717-722. DOI:10.1111/jph.12009
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E and Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología 34:84-99. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Sánchez J, Correa M y Castañeda-Sandoval LM. 2016. *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbológico de los alimentos. Revista Facultad Nacional de Salud Pública 34(2):230-242. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12

- Sanogo S and Ji P. 2013. Water management in relation to control of *Phytophthora capsici* in vegetable crops. *Agricultural Water Management* 129:113-119. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.07.018>
- Segarra G, Aviles M, Casanova E, Borrero A and Trillas I. 2013. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. *Phytopathology Mediterraneana* 52(1):77-83. <http://hdl.handle.net/11441/30458>
- Shanmugam V and Kanoujia N. 2011. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control* 57:85-93. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.02.001>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Cierre de la producción agrícola por estado. www.siap.gob.mx.
- Thampi A and Bhai RS. 2017. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control* 109:1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.006>
- Torres MJ, Brandan CP, Sabaté DC, Petroselli G, Erra-Balsells R and Audisio MC. 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBac-CA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control*. 105:93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.12.001>
- Torres MJ, Perez Brandan CP, Petroselli G, Erra-Balsells R and Audisio MC. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research* 182:31-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>
- Wang CK, Liang CY, Chu CH and Lin MJ. 2011. Genetic comparison of sexual and asexual reproduction of *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology Bulletin* 20:98-107. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123409244>
- Wei Z, Huang J, Yang Ch, Xu Y, Shen Q and Chen W. 2015. Screening of suitable carriers for *Bacillus amyloliquefaciens* strain QL-18 to enhance the biocontrol of tomato bacterial wilt. *Crop Protection* 75:96-103. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.05.010>
- Yang R, Fan X, Cai X and Hu F. 2015. The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacteria strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper *phytophthora* blight. *Biological Control* 85:59-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.013>
- Yu SM and Lee YH. 2013. Effect of light quality on *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36 and its biocontrol efficacy. *Biological Control* 64:203-210. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.004>
- Zhang JX, Gu YB, Chi FM, Ji ZR, Wu JY, Dong QL and Zhou ZS. 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* GB1 can effectively control apple valsa canker. *Biological Control* 88:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.022>
- Zhang S, White TL, Martinez MC, McInroy JA, Kloepper JW and Klassen W. 2010. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control* 53:129-135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.015>
- Zhao P, Quan C, Wang Y, Wang J and Fan S. 2013. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Journal of Basic Microbiology* 54:448-456. DOI: 10.1002/jobm.201200414
- Zheng M, Shi J, Shi J, Wanga Q and Li Y. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control* 65:200-206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.004>
- Zhi Y, Wu Q and Xu Y. 2017. Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresource Technology* 235:96-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090>

Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico

Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México

María Eugenia Rentería-Martínez, Miguel Ángel Guerra-Camacho, Andrés Ochoa-Meza, Sergio Francisco Moreno-Salazar*, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Carretera Hermosillo-Bahía Kino Km. 21, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México; Alejandro Varela-Romero, Luis Enrique Gutiérrez-Millán, Posgrado en Biociencias, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Luis Donaldo Colosio S/N, Colonia Centro, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México; Amparo del Carmen Meza-Moller, Universidad Estatal de Sonora, Avenida Ley Federal del Trabajo S/N, Colonia Apolo, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México. *Autor para correspondencia: smoreno@guayacan.uson.mx.

Recibido: 05 de Octubre, 2017.

Aceptado: 31 de Diciembre, 2017.

Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán LE, Meza-Moller AC. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 233-255.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-1

Primera publicación DOI: 09 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 09, 2018.

Resumen. El estado de Sonora es uno de los principales productores de sandía en México. Cada año, los productores locales enfrentan problemas fitosanitarios, provocados principalmente por hongos del suelo. En el presente estudio se analizó la presencia de hongos patógenos asociados con pudrición de raíz en plantas de sandía en las dos zonas de mayor producción en Sonora. El análisis

Abstract. The state of Sonora is one of the main producers of watermelons in Mexico. Each year, agricultural producers deal with phytosanitary issues like soilborne pathogens. In this study the presence of phytopathogenic fungi associated to watermelon root rot was analyzed in the main production regions of Sonora. Morphological analysis revealed three genera: *Fusarium* (73%), *Ceratobasidium* (20%) and *Rhizoctonia* (6%). Through a multilocus phylogenetic analysis (ITS1, TEF and RPB2 for *Fusarium*; ITS1 and RPB2 for *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium*), the following species were identified: *Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum*. In addition to this, two anastomosing groups for *Ceratobasidium* sp. (AG-F y AG-A) and two for *Rhizoctonia* spp. (AG-4 y AG-6) were identified. Pathogenicity assays showed that the representative isolates from these five different species caused root rot wounds and wilting in watermelon plantlets 21

morfológico reveló la presencia de tres géneros de hongos: *Fusarium* (73%), *Ceratobasidium* (20%) y *Rhizoctonia* (6%). Mediante un análisis filogenético multilocus (ITS1, TEF y RPB2 para *Fusarium*; ITS1 y RPB2 para *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium*), se identificó a: *F. falciforme*, *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum*; además de dos grupos anastomóticos de *Ceratobasidium* sp. (AG-F y AG-A) y dos de *Rhizoctonia* sp. (AG-4 y AG-6). Aislados representativos de estas cinco especies causaron pudrición de raíz y marchitez de plántulas de sandía a los 21 días después de su inoculación. En este estudio se informa por primera vez de *F. falciforme* y se define a nivel de grupos anastomóticos las cepas de *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium* como causantes de pudrición radicular en sandía en la región.

Palabras clave: análisis multilocus, *Fusarium*, *Ceratobasidium*, *Rhizoctonia*

México es el principal exportador de sandía en el mundo, aportando 23% de este fruto al comercio mundial (FAO, 2014), principalmente a Estados Unidos, Canadá y los Países Bajos. En los últimos diez años las exportaciones han crecido a una tasa promedio anual de 8% (SAGARPA, 2014). Sonora es el principal productor de sandía (*Citrullus lanatus*) en México. En 2016 se plantaron más de 9 000 ha en este estado (SIAP, 2017). No obstante, uno de los factores limitantes en la producción de sandía en este estado, son las enfermedades radiculares. En 2013, en ciertas plantaciones de sandía establecidas en los valles de Guaymas y la Costa de Hermosillo en Sonora, regiones que concentran alrededor del 96 % de la superficie estatal establecida con este cultivo, se observó que, previamente a su madurez fisiológica, ciertas plantas presentaron un amarillamiento y marchitamiento de hojas; días después las plantas murieron. El análisis visual

days post inoculation. In this study, *F. falciforme* is reported for the first time and anastomotic groups for *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium* are defined as causal agents of watermelon root rot in the region.

Key words: MLST, *Fusarium*, *Ceratobasidium*, *Rhizoctonia*

Mexico is the world's leading exporter of watermelon, with 23% of the total worldwide supply of the fruit (FAO, 2014), mainly to the United States, Canada and the Netherlands. In the last ten years, world exports have grown to an average rate of 8% a year (SAGARPA, 2014). Sonora is the main producer of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Mexico. In 2016, over 9 thousand hectares of this crop were planted in this state (SIAP, 2017). However, one of the limiting factors in Sonora's watermelon production are root diseases. In 2013, in certain watermelon plantations in the valleys of Guaymas and the Coast of Hermosillo in Sonora, areas that concentrate over 96% of the surface in the state with this crop, it was observed that before physiological maturity, certain plants presented yellowing and wilting of leaves; days later, the plants died. A visual analysis showed the presence of lesions and rotting in the cortex of the base of the stem and the top section of the main root, as well as rotting in the main and secondary roots, typical of diseases caused by fungi (Meza-Möller *et al.*, 2014).

To date there is no knowledge on work published concerning the fungal complexes related to root rotting in watermelon plants grown in Sonora; diagnoses are generally based only on the symptoms of the crop and, in the best of cases, on the morphology of the colonies and the observation of reproductive structures. It is frequently mentioned that the root diseases in watermelon

demonstró la presencia de lesiones y pudrición en la corteza de la base del tallo y la parte superior de la raíz principal, además de pudriciones en las raíces principales y secundarias, típicas de las enfermedades ocasionadas por hongos (Meza-Möller *et al.*, 2014).

A la fecha no se tiene conocimiento de trabajos publicados acerca del complejo de hongos asociados a la pudrición de raíces en las plantas de sandía cultivadas en Sonora; generalmente los diagnósticos se basan solo en la sintomatología del cultivo y en el mejor de los casos en la morfología de las colonias y observación de estructuras reproductivas. Recurrentemente se menciona que las enfermedades radiculares de sandía cultivada en la región son debidas al ataque de: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* o *Rhizoctonia solani*.

Las especies pertenecientes al género *Fusarium* (Nectriaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota), son ubicuas y de gran importancia económica en la agricultura, ya que muchas de ellas son patógenas para las plantas. Algunas de sus especies también producen toxinas nocivas para humanos y animales. Este grupo monofilético está conformado por 20 clados que incluyen más de 300 especies. Con algunas excepciones, las especies de *Fusarium* producen las características macroconidias multi-septadas y con forma de huso; pero además existen otras características morfológicas que permiten diferenciar entre especies (O'Donnell *et al.*, 2013; Geiser *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2015).

En el complejo *Rhizoctonia*, la morfología hifal y configuración del septo permiten diferenciar los géneros; mientras que las especies pueden ser distinguidas por el número de núcleos presentes en las células somáticas de hifas jóvenes y el grosor de las hifas guías, o por las características morfométricas de las estructuras reproductivas sexuales (Cedeño, 2008). El grupo de *Rhizoctonia* multinucleadas incluye a *R. solani*, *R. zae* y *R. oryzae*.

plants produced in the area are due to the attack of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* or *Rhizoctonia solani*.

The species belonging to the genus *Fusarium* (Nectriaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota), are ubiquitous and economically very important in agriculture, since most of them are pathogenic for plants. Some of their species also produce toxins harmful to humans and animals. This monophyletic group is composed of 20 clades that include over 300 species. With some exceptions, the *Fusarium* species produce the multi-shafted, macroconidial features and spindle shapes; but there are also other morphological characteristics that help to tell species apart (O'Donnell *et al.*, 2013; Geiser *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2015).

In the *Rhizoctonia* complex, the hyphal morphology and configuration of the septum help differentiate the genera, whereas species can be told apart by the number of nuclei present in the somatic cells of young hyphae and the thickness of the guide hyphae, or by the morphometric characteristics of the sexual reproductive structures (Cedeño, 2008). The group of multinuclear *Rhizoctonia* includes *R. solani*, *R. zae* and *R. oryzae*.

R. solani [teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*] (Ceratobasidiaceae: Cantharellales: Agaricomycetes: Basidiomycota), groups a heterogenous mixture of strains that cause root rotting in many crops around the world (González, 2013). According to the hyphal fusion analysis (anastomosis), these strains are split into 14 anastomotic groups (AG), labelled between AG-1 and AG-13, plus AG-BI (Carling *et al.*, 2002). The group of binuclear *Rhizoctonia* corresponds to the teleomorphs *Ceratobasidium* spp. and *Tulasnella* spp. According to Sharon *et al.* (2008), *Ceratobasidium* is composed of 21 anastomotic groups identified as AG-A to AG-U, some of which are highly pathogenic in different plant species.

R. solani [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*] (Ceratobasidiaceae: Cantharellales: Agaricomycetes: Basidiomycota), agrupa una mezcla heterogénea de cepas causantes de pudrición radicular en muchos cultivos alrededor del mundo (González, 2013). De acuerdo al análisis de fusión hifal (anastomosis), estas cepas se separan en 14 grupos anastomóticos (AG), designados desde AG-1 hasta AG-13 más AG-BI (Carling *et al.*, 2002). El grupo de *Rhizoctonia* binucleadas corresponde a los teleomorfos *Ceratobasidium* spp. y *Tulasnella* spp. De acuerdo a Sharon *et al.* (2008), *Ceratobasidium* consta de 21 grupos anastomóticos identificados como AG-A hasta AG-U, algunos de los cuales son altamente patogénicos en diferentes especies vegetales.

En el pasado la taxonomía de hongos se basaba en la morfología de sus estructuras reproductivas en el estado anamórfico. El concepto de especie morfológica aún prevalece como el método de diagnóstico más usual para diferenciar entre especies de hongos, debido a que los caracteres morfológicos de los individuos son fácilmente detectables y comparables. Sin embargo, no es un método capaz de detectar diferencias entre especies cercanas, subestimando la verdadera diversidad fúngica (Taylor *et al.*, 2000).

Las técnicas moleculares basadas en análisis de ADN superan las desventajas de la identificación morfológica ya que son rápidas, precisas, objetivas y aplicables a un gran número de muestras. Permiten diferenciar entre genotipos y establecer índices de variabilidad genética existente dentro de una población (Narayanasamy, 2011). En años recientes se ha popularizado el concepto de especie filogenética entre los hongos filamentosos, basado en la concordancia de secuencias de múltiples genes de ADN; este enfoque filogenético permite definir mejor las especies (Taylor *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2013).

In the past, fungus taxonomy was based on the morphology of their reproductive structures in the anamorphic state. The concept of morphological species still prevails as the most common diagnostic method to differentiate fungal species, since the morphological characteristics of individuals are easily traceable and comparable. However, this method is unable to find differences between nearby species, underestimating the true fungal diversity (Taylor *et al.*, 2000).

The molecular techniques based on DNA analysis surpass the disadvantages of morphological identification, since they are quick, precise, objective and applicable to a large number of samples. They help differentiate between genotypes and to establish genetic variability indices within a population (Narayanasamy, 2011). In recent years, the concept of phylogenetic species between filamentous fungi has become increasingly popular, based on the consistency of multiple DNA gene sequences; this phylogenetic approach helps define species better (Taylor *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2013).

Since White *et al.* (1990) published the sequences of primers that allowed the amplification and sequencing of sections of the rDNA operon, an interest arose in phylogenetic research, which now dominates fungal taxonomy. The sequencing of the ITS fragments of rDNA continues to be the most widely accepted approach in molecular mycology to classify and identify specimens or cultures of unknown fungi. However, its resolution in taxonomic relations of a higher level is inferior to many other genes. Numerous studies have been carried out to identify *loci* with characteristics of adequate primary barcodes. The AFTOL (Assembling the fungal tree of life) project, completed in 2008, has established a phylogeny based on the amplification of genes RPB1, RPB2, nucLSU, nucSSU, mtSSU, TEF1 α and mtATP6

Desde que White *et al.* (1990) publicaron las secuencias de cebadores que permitieron la amplificación y secuenciación de secciones del operón de rDNA, surgió un marcado interés en la investigación filogenética, que ahora domina la taxonomía fúngica. La secuenciación de los fragmentos ITS de rDNA, sigue siendo el enfoque más ampliamente aceptado en la micología molecular para clasificar e identificar especímenes o cultivos de hongos desconocidos. Sin embargo, su resolución en relaciones taxonómicas de nivel superior es inferior a muchos otros genes. Numerosos estudios se han realizado para identificar *loci* con características de código de barras primarias adecuadas. El proyecto AFTOL (Assembling the fungal tree of life), completado en 2008, ha establecido una filogenia basada en la amplificación de los genes: RPB1, RPB2, nucLSU, nucSSU, mtSSU, TEF1 α y mtATP6 (Stielow *et al.*, 2015). El conocimiento de las especies causantes de una enfermedad es indispensable para su adecuado manejo y control.

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar las especies de hongos causantes de pudrición radicular en plantas de sandía en la Costa de Hermosillo y Valle de Guaymas en Sonora, en base a análisis morfológicos y de filogenia multilocus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo: El estudio se realizó durante los ciclos primavera-verano 2013 y 2014, en cuatro campos comerciales, dos localizados en la Costa de Hermosillo (CH1, CH2) y dos en el Valle de Guaymas (VG1, VG2), en Sonora, México que representan el 10% de la superficie establecida con sandía en el estado. Las variedades cultivadas en estos campos fueron Sugar Red, SuperSeedless 7187HQ F1 y Precious Petit. En cada ciclo se colectaron alea-

(Stielow *et al.*, 2015). Knowing the species that cause a disease is crucial for their adequate management and control.

Based on this, the aim of the present investigation was to identify the fungus species that cause rotting of the roots in watermelon plants in the Coast of Hermosillo and Valley of Guaymas in Sonora, based on morphological and multilocus phylogeny analyses.

MATERIALS AND METHODS

Sampling: The study was carried out during the spring-summer cycles of 2013 and 2014, in four commercial fields, two of which were located on the Coast of Hermosillo (CH1, CH2) and two in the Valley of Guaymas (VG1, VG2), in Sonora, Mexico, which account for 10% of the state's surface used for the production of watermelon. The varieties planted in these fields were Sugar Red, SuperSeedless 7187HQ F1 and Precious Petit. In each cycle, 40 plants (10 plants per field) were collected at random in the areas with wilting and dryness of runners. The samples were placed in polyethylene bags, which were labelled and transported in containers with ice to the laboratory for processing.

Fungal isolation. The plant roots were washed using water, dried with paper towels, and cut into 1 cm pieces. Segments were taken from the crown, main root and secondary roots. They were disinfected by submerging them for 2 min in a solution prepared with sodium hypochlorite at 6%, ethyl alcohol at 96% and sterilized distilled water in a 1:1:8 ratio, respectively. They were then placed in dishes with agar-water at 2%. The dishes were incubated at 25 ± 0.1 °C until the mycelium produced from the pieces of plant allowed for the extraction of a

toriamente 40 plantas (10 plantas por campo) en las zonas donde se observaba marchitez y secazón de guías. Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno etiquetadas y transportadas en contenedores con hielo al laboratorio para su procesamiento.

Aislamiento fúngico. Las raíces de plantas enfermas se lavaron con agua, se secaron con papel secante y se cortaron en pedazos de 1 cm. Se tomaron segmentos de la corona, raíz principal y raíces secundarias. Se desinfectaron sumergiéndolos por 2 min en una solución preparada con hipoclorito de sodio al 6%, alcohol etílico al 96% y agua destilada esterilizada en proporción 1:1:8, respectivamente. Posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, se secaron en papel secante estéril y se colocaron en cajas con agar-agua al 2%. Las cajas se incubaron a 25 ± 0.1 °C hasta que el micelio emergido de los trozos vegetales permitió tomar una punta de hifa. Las puntas de hifas fueron cultivadas sucesivamente en Agar Dextrosa y Papa (PDA) suplementado con una solución de estreptomycin/neomicina e incubados a 25 ± 0.1 °C, hasta obtener un cultivo puro.

Caracterización morfológica y cultural. Todos los aislados fueron agrupados en base a las características de las colonias y al color desarrollado en el anverso y reverso de la caja de PDA. Un aislado representativo de cada grupo fue utilizado para la caracterización morfológica. En los aislados con características de *Fusarium* se determinó la presencia y morfología de microconidias, macroconidias y clamidosporas a partir de su crecimiento en agar hojas de clavel (CLA), después de siete días en oscuridad a 25 ± 0.1 °C (Leslie and Summerell, 2006). Los aislados con características del género *Rhizoctonia* se identificaron mediante la observación de características vegetativas como la coloración del

hypha tip. The hypha tips were planted successfully in Potato Dextrose Agar (PDA) supplemented with a solution of streptomycin/neomycin and incubated at 25 ± 0.1 °C, until a pure culture was obtained.

Morphological and cultural characterization. All isolates were grouped based on the characteristics of the cultures and the color developed on both sides of the PDA plate. A representative of each group was used for the morphological characterization. In the isolations with characteristics of *Fusarium* the presence and morphology of microconidia, macroconidia, and Chlamydospores was established from their growth in carnation leaf agar (CLA), after seven days in the dark at 25 ± 0.1 °C (Leslie and Summerell, 2006). The isolations with characteristics of *Rhizoctonia* genus were identified by observing vegetative characteristics such as the color of the mycelium, septa, constrictions near the ramifications, during growth in PDA or Malt Extract Agar (MEA). To determine the number of nuclei, hyphae were stained with trypan blue in lactophenol. Growth rate was determined in PDA, keeping the cultures at 25 ± 0.1 °C and photoperiods of 14h/10h of light/darkness. The diameter of the culture was measured every 24 h until the mycelium covered the dish completely (Sneh *et al.*, 1996). All isolations were initially identified up to the genus level.

DNA Extraction. A mycelia from pure cultures in PDA were taken with a sterile microbiological spatula and placed in a tube of the Kit Power Soil DNA Isolation (MoBIO Laboratories, California, U.S.A.). Cell lysis was carried out in a Precellys Evolution Homogenizer (Bertin Technologies, France), stirring the tubes at 6500 rpm for three 20 s cycles with 20 s pauses. DNA integrity was verified in a 2% agarose gel. The extracted DNA was quantified in the NanoDrop 1000

micelio, septos, constricciones cerca de la ramificación, durante el crecimiento en PDA o agar extracto de malta (MEA). Para la determinación del número de núcleos, las hifas se tiñeron con azul de tripano en lactofenol. La velocidad de crecimiento se determinó en PDA, manteniendo los cultivos a 25 ± 0.1 °C y fotoperiodo de 14h/10h, de luz/oscuridad. Se midió el diámetro de las colonias cada 24 h, hasta que el micelio cubrió completamente la caja (Sneh *et al.*, 1996). Todos los aislados fueron identificados inicialmente hasta nivel de género.

Extracción de ADN. El micelio proveniente de cultivos puros en PDA, se recogió con espátula microbiológica estéril y se colocó en un tubo del Kit Power Soil DNA Isolation (MoBIO Laboratories, California, EUA). La lisis celular se llevó a cabo en un homogeneizador Precellys Evolution (Bertin Technologies, Francia), agitando los tubos a 6500 rpm durante tres ciclos de 20 s con pausas de 20 s. La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 2%. El ADN extraído, se cuantificó en el NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Sólo se amplificaron muestras con una relación de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Amplificación y secuenciación de ADN. Se amplificó la región no codificante del espaciador transcrito interno (ITS) y una parte de la región que codifica para la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2) de todos los aislados obtenidos. Adicionalmente, se amplificó la región que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1 α (TEF-1 α) para los aislados con características de *Fusarium*. La información sobre los primers empleados se muestra en la Cuadro 1.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó mezclando 12.5 ml de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 ml de cada primer forward y

(ThermoScientific). Samples with an absorbance ratio of 260/280 between 1.8 and 2 were amplified. The DNA was stored at -20°C until its use.

DNA amplification sequencing. The non-coding region of the internal transcribed spacer (ITS) was amplified with a segment of the region that codified for the DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) of all the isolations obtained. In addition, it was amplified the region that codifies for translation elongation factor 1- α (TEF1) for the isolates with *Fusarium* characteristics. Information about the primers used is shown in Table 1.

The polymerase chain reaction was carried out by mixing 12.5 ml of GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 μ l of each forward and reverse primer (IDT Technologies) 10 mM, 1 μ l of DNA (1 ng/ μ l) and molecular biology degree water up to 25 μ l final volume. The PCR products were separated by electrophoresis in agarose gel at 2%, dyed with GelRed (Biotium Inc) in 5X Green GoTaq reaction buffer (Promega) 15 μ l:1ml. They were visualized in UV light (DigiDoc-It™, UVP) observing the size of the amplicon and its purity. Purification was carried out using ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) or with by cutting bands of the expected size with the Wizard® SV Gel kit and PCR Clean-Up System (Promega). Purified amplicons were sequenced in both directions with ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) in GENEWIZ. Each sequence was reviewed manually and nucleotides in ambiguous positions were corrected with complementary sequences obtained with both primers, using the software ChromasPro v2.1.6. The sequences from regions ITS, RPB2 and TEF were compared by alignment with those contained in the databases *Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>), *Fusarium* ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) and in

Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados en este estudio.
Table 1. Oligonucleotides used in this study.

| Locus | Primer | Oligonucleótidos (5'-3') | (pb) | Referencia |
|-------------------|-----------|--------------------------|-------|--------------------------------|
| ITS | ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | ≈ 550 | White <i>et al.</i> (1990) |
| | ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC | | |
| TEF-1a | EF1 | ATGGGTAAGGARGACAACAC | ≈ 700 | O'Donnell <i>et al.</i> (1998) |
| | EF2 | GGARGTACCAGTSATCAT | | |
| RPB2 ^x | RPB2-5F2 | GGGGWGAYCAGAAGAAGGC | ≈ 900 | O'Donnell <i>et al.</i> (2013) |
| | fRPB2-7cR | CCCATRGTGTYTRCCCAT | | |
| RPB2 ^z | RPB2-980F | TGYCCIGCIGARACICCHGARGG | ≈ 674 | González <i>et al.</i> (2016) |
| | fRPB2-7cR | CCCATRGTGTYTRCCCAT | | |

^x Específicos para el género *Fusarium* / Specific to the genus *Fusarium*.

^z Específicos para el género *Rhizoctonia* / Specific to the genus *Rhizoctonia*.

reverse (IDT Technologies) a una concentración 10 mM, 1 µl de ADN a una concentración de 1 ng/ml y agua grado biología molecular hasta obtener un volumen final de 25 µl. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, mezclados previamente con GelRed (Bio-tium Inc) en 5X Green GoTaq reaction buffer (Promega) 15 µl:1ml. Se visualizaron en luz UV (DigiDoc-It™, UVP) observando el tamaño del amplicón y su pureza. La purificación se realizó con ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) o mediante el corte de bandas del tamaño esperado con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Los amplicones purificados se secuenciaron en ambas direcciones con el equipo ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) en GENEWIZ. Cada secuencia se revisó manualmente y los nucleótidos en posiciones ambiguas se corrigieron con las secuencias complementarias obtenidas con ambos primers, usando el software ChromasPro v2.1.6. Las secuencias de las regiones ITS, RPB2 y TEF de *Fusarium* se compararon mediante alineamiento, con las contenidas en las bases de datos: *Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>), Fusarium ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) y National Center for Biotechnology Information (NCBI), donde también se compararon las secuencias de las regiones ITS y RPB2 de

the National Center for Biotechnology Information (NCBI), in which the sequences from regions ITS and RPB2 of *Rhizoctonia* spp. were also compared, using the “Basic local alignment search tool” (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

Phylogenetic analysis. The *Fusarium* species and the anastomotic groups of *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium* were determined separately in two data matrices. In each case, several alignments were carried out using the software Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). The sequences were linked and edited using the software UltraEdit32. The phylogenetic analysis of each data matrix was carried out separately under the criterion of Maximum Likelihood Estimation (MLE) with the software PAUP 4.0a152 (Swofford, 2002). The best nucleotide substitution model was established using ModelTest (Posada and Crandall, 1998). The trees were viewed and modified in FigTree and exported to graphic editors. The consensus trees for *Rhizoctonia* spp. and *Fusarium* spp., were rooted using *Botryobasidium simile* (isolation GEL2348) and *Neofusicoccum parvum* (strain CCF216), respectively.

Pathogenicity tests. In compliance with Koch's postulates, to assure that the isolates obtained were

Rhizoctonia spp., mediante la herramienta “Basic local alignment search tool” (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

Análisis filogenético. La determinación de las especies de *Fusarium* y de los grupos anastomóticos de *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium*, se realizó por separado en dos matrices de datos. En cada caso, se realizaron múltiples alineamientos usando el software Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). La concatenación y edición de las secuencias se realizó con el software UltraEdit32. El análisis filogenético de cada matriz de datos se realizó por separado bajo el criterio de Máxima Verosimilitud (MV) con el software PAUP 4.0a152 (Swofford, 2002). Se estableció el mejor modelo de sustitución de nucleótidos con ModelTest (Posada y Crandall, 1998).

Los árboles se visualizaron y modificaron en FigTree y se exportaron a editores gráficos. Los árboles consenso para *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp., se enraizaron con *Botryobasidium simile* (aislado GEL2348) y *Neofusicoccum parvum* (cepa CCF216), respectivamente.

Pruebas de patogenicidad. En cumplimiento con los postulados de Koch, para comprobar que los aislados obtenidos son los agentes causales de la pudrición de raíz en plantas de sandía, se seleccionó aleatoriamente un cultivo monospórico de cada una de las especies identificadas en el análisis molecular. Los tratamientos fueron: 1) Testigo sin inocular, 2) *F. falciforme*, 3) *F. oxysporum*, 4) *F. brachygibbosum*, 5) *R. solani*, 6) *Ceratobasidium* sp., 7) *F. brachygibbosum* + *F. solani*, 8) *F. brachygibbosum* + *F. oxysporum*, 9) *R. solani* + *Ceratobasidium* sp. 10) *Ceratobasidium* sp. + *F. solani* y 11) *Ceratobasidium* sp. + *F. oxysporum*. Se utilizaron plantas sanas de las variedades SuperSeedless 7187HQ F1 y Precious Petit, de 21 días de edad, establecidas en macetas con una mezcla de

the causal agents of the root rotting in watermelon plants, a monosporic culture was chosen at random from each one of the species identified in the molecular analysis. The treatments were: 1) Non-inoculated control, 2) *F. falciforme*, 3) *F. oxysporum*, 4) *F. brachygibbosum*, 5) *R. solani*, 6) *Ceratobasidium* sp., 7) *F. brachygibbosum* + *F. solani*, 8) *F. brachygibbosum* + *F. oxysporum*, 9) *R. solani* + *Ceratobasidium* sp. 10) *Ceratobasidium* sp. + *F. solani* and 11) *Ceratobasidium* sp. + *F. oxysporum*. Healthy plants of the varieties SuperSeedless 7187HQ F1 and Precious Petit, aged 21 days, established in pots with a mixture of soil and perlite (1:3). Six plants were inoculated for each treatment. Each plant was treated with rotting and discoloration of vascular bundles, typical symptoms of damages by *Fusarium* spp. Four discs, 8 mm in diameter, were placed around the root. Healthy plants treated with sterile PDA discs were used as controls. The pots were placed in a controlled environment chamber at 25 ± 0.1 °C, with a photoperiod of 14h/10h day/night, until the appearance of symptoms. Irrigation was carried out based on water requirements, and a Hoagland nutrient solution was applied on a weekly basis. The number of disease plants was observed. The percentage of infected roots was determined using ten root segments from each plant. These tissue fragments were disinfected separately and placed in PDA. The evaluation was carried out observing the development of mycelia after seven-day incubation.

RESULTS

Damages observed during sampling. Figure 1A shows the damages observed in the crop. Plants with symptoms displayed different types of rotting in the crown, stem, roots and rootlets. One type of

suelo:perlita (1:3). Se inocularon seis plantas por cada tratamiento. Cada planta se trató con micelio de cinco días de crecimiento en PDA. Se colocaron cuatro discos de 8 mm de diámetro alrededor de la raíz. Plantas sanas tratadas con discos de PDA estéril se utilizaron como testigo. Las macetas se colocaron en una cámara de ambiente controlado a 25 ± 0.1 °C, con un fotoperiodo de 14h/10h día/noche, hasta la aparición de los síntomas. El riego se realizó en base a los requerimientos hídricos y cada semana se aplicó solución nutritiva de Hoagland. Se observó el número de plantas enfermas. El porcentaje de raíces infectadas se determinó utilizando diez segmentos de raíz de cada planta. Estos fragmentos de tejido se desinfectaron por separado y se colocaron en PDA. La evaluación se realizó observando el desarrollo de micelio después de 7 días de incubación.

RESULTADOS

Daños observados durante el muestreo. La Figura 1A muestra los daños observados en el cultivo. Las plantas sintomáticas presentaron diferentes tipos de pudrición en la corona, tallo, raíces y raicillas. Un tipo de lesiones fueron pequeñas, hundidas y no hundidas, de color marrón (Figura 1B) y de aspecto húmedo, típicas de *Rhizoctonia* sp. En ciertos casos este tipo de lesiones se observaron con pequeñas pústulas. En otras plantas las lesiones

lesion was small, concave or not, brownish (Figure 1B) and moist-looking, typical in *Rhizoctonia* sp. In certain cases, this type of lesions was observed to have small pustules. In other plants, lesions were light brown, discolored and with vascular beam rot, typical in symptoms of damages by *Fusarium* spp. (Figure 1C).

Isolation and morphology of the colonies and reproductive structures of fungi. A total of 45 fungal isolates were obtained from the four sampling sites, and in each one, at least one species of *Rhizoctonia* and *Fusarium* was isolated. The distribution of species by site is shown in Figure 2.

The morphological analysis helped to form two groups of isolates. One group was formed of 13 isolations that presented colonies with abundant aerial hyphae, ivory-colored at first, turning light brown or brown after 7 days. In these isolations, hyphae were robust, with branches in right angles, constriction of the ramification and the formation of a septum near the point of origin, without spores, all of which are typical characteristics of *Rhizoctonia* sp. (Sneh *et al.*, 1996). Average growth rate was 1.25 mm h^{-1} . Nuclei staining revealed the presence of isolates with both binuclear and multinuclear cells (Figure 3).

The second group of 32 isolates showed the formation of macroconidia, microconidia, chlamydospores and monophyalides in CLA, typical of *Fusarium* sp., according to descriptions



Figura 1. Daños en plantas cultivadas de sandía. A) Daño en campo, B) Raíces de plantas enfermas, C) Daño vascular.
Figure 1. Damage on planted watermelon crops. A) Damage on the field, B) Roots of diseased plants, C) Vascular damage.

fueron de color café claro, con decoloración y pudrición de haces vasculares, típicas de síntomas de daños por *Fusarium* spp. (Figura 1C).

Aislamiento y morfología de las colonias y estructuras reproductivas de los hongos. En total, se obtuvieron 45 aislados fúngicos provenientes de los cuatro sitios de muestreo y en cada sitio se aisló al menos una especie de *Rhizoctonia* y *Fusarium*. La distribución de especies por sitio se muestra en la Figura 2.

El análisis morfológico permitió formar dos grupos de aislados. Un grupo formado de 13 aislados que presentaron colonias con abundantes hifas aéreas, de color marfil al inicio, tornándose café claro o marrón después de siete días. En estos aislados las hifas fueron robustas con ramificaciones en ángulo recto, constricción de la ramificación y formación de un septo cercano al punto de origen, sin presencia de esporas, características típicas de *Rhizoctonia* sp. (Sneh *et al.*, 1996). La velocidad de crecimiento promedio fue de 1.25 mm h⁻¹. La tinción de núcleos reveló la presencia tanto de aislados con células binucleadas, como multinucleadas (Figura 3).

El segundo grupo de 32 aislados mostró la formación de macroconidias, microconidias, clamidosporas y monofiálides en CLA, típicas de *Fusarium* sp., según las descripciones de Leslie y Summerell (2006). 25 aislados se ajustaron a la descripción de *F. solani*: colonias color crema con pigmentos rojo a gris oscuro en el anverso, microconidias ovales sin septos, monofiálides largas, clamidosporas solas o en pares, abundantes macroconidias rectas con 3 a 5 septos. Otros 2 presentaron características propias de *F. oxysporum*: micelio algodonoso, escaso blanco a violeta pálido y morado en el agar; monofiálides cortas. El resto de los aislados produjo micelio blanco, el cual se tornaba rosado, con esporodoquios de color amarillo;

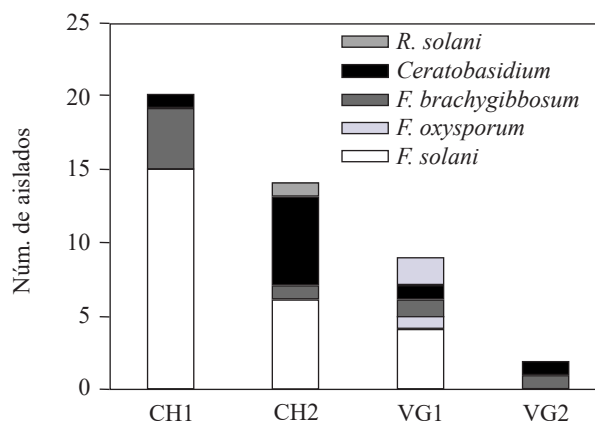


Figura 2. Distribución de especies de hongos patógenos, por sitios de muestreo. CH1= Costa de Hermosillo 1. CH2=Costa de Hermosillo 2. VG1=Valle de Guaymas 1. VG2=Valle de Guaymas 2.

Figure 2. Distribution of pathogenic fungi species, by sampling sites. CH1= Coast of Hermosillo 1. CH2=Coast of Hermosillo 2. VG1=Valley of Guaymas 1. VG2=Valley of Guaymas 2.

by Leslie and Summerell (2006). Twenty-five isolations fit the description of *F. solani*: cream-colored colonies with red to dark gray pigments in the obverse oval-shaped microconidia without septa, long monophyalides, single or paired chlamydo spores, abundant straight macroconidia with 3 to 5 septa. Other 2 presented typical characteristics for *F. oxysporum*: cottonlike mycelia, scarce white to pale violet and purple color in the agar; short monophyalides. The rest of the isolates produced white mycelia, which turned pink, with yellow sporodochia; oval unicellular microconidia, produced in monophyalides, curved macroconidia with 3 to 5 septa, with wide central cells, slightly pointy apex, single or chained chlamydo spores (Figure 3). No isolations were found with different morphology to *Rhizoctonia* or *Fusarium*.

Molecular identification and phylogenetic analysis of fungi. A first BLAST analysis from the region between the internal transcribed spacers

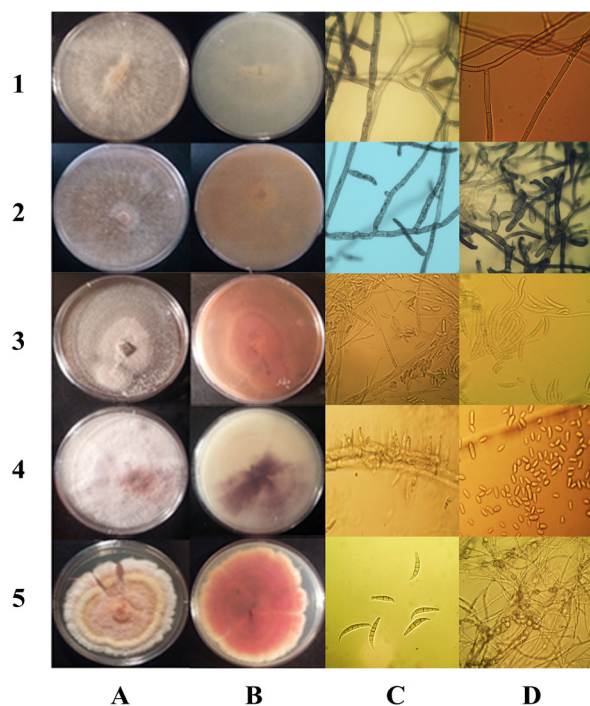


Figura 3. Morfología de las colonias y coloración del medio en PDA de *Rhizoctonia* spp., *Ceratobasidium* sp., *F. falciforme*, *F. oxysporum*, *F. brachygibbosum*, (1A-5A y 1B-5B) respectivamente. (1C) Hifas polinucleadas. (1D) Septos. (2C) Hifas binucleadas. (2D) Células monilioides. (3C) Monofialides y microconidias. (3D) Macroconidias. (4C) Microconidia *in situ* en CLA. (4D) Microconidia. (5C) Macroconidia. (5D) Clamidosporas.

Figure 3. Morphology of the colonies and colors of the medium in PDA of *Rhizoctonia* spp., *Ceratobasidium* sp., *F. falciforme*, *F. oxysporum*, *F. brachygibbosum*, (1A-5A and 1B-5B) respectively. (1C) Polynuclear hyphae. (1D) Septa. (2C) Binuclear hyphae. (2D) Monilioid cells. (3C) Monophialides and microconidia. (3D) Macroconidia. (4C) Microconidia *in situ* in CLA. (4D) Microconidia. (5C) Macroconidia. (5D) Clamidospores.

microconidias ovales unicelulares, producidas en monofialides, macroconidias curvadas de 3 a 5 septos, con células centrales anchas, ápice ligeramente agudo, clamidosporas solas o en cadena (Figura 3). No se detectaron aislados con morfología diferente a *Rhizoctonia* o *Fusarium*.

I and II (ITS1-ITS2) of all the isolates helped determine that 25 sequences had a similarity of 99-100% with *F. solani*; 5 to *F. brachygibbosum*, 2 to *F. oxysporum*, 10 to *Ceratobasidium* sp. and 3 sequences to *Rhizoctonia solani* also with a similarity of 99-100% to NCBI homologous sequences.

The phylogenetic analysis under the ML criterion for the *Fusarium* genus was carried out with the linked matrix of genes ITS, RPB2 and TEF1 of the 32 isolations of this study and of 25 reference strains deposited in culture collections (Al-Hatmi *et al.*, 2016). The best nucleotide substitution model was TIM2+I+G. Total of 1816 nucleotides were considered in the data set. The multilocus analysis helped define the correct identity of the isolations initially proposed as *F. solani*, since they form a separate clade with a similarity of 100 % with the type isolations of *F. falciforme*, a member of the *Fusarium solani* species complex (FSSC). The identity of *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum* was corroborated (Figure 4).

A similar analysis was carried out with the sequences of isolations from *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium* sp. a data matrix was integrated by the regions ITS and RPB2 of 49 isolations, including those from the present study and 36 references strains (*Cantharellales*), obtained from culture collections (González *et al.*, 2016). The best nucleotide substitution model was GTR+I+G. Total of 1355 nucleotides were considered from each isolation in the data set. This analysis established the identity of two anastomotic groups for the genus *Rhizoctonia*, AG-4 and AG-6 and two for the genus *Ceratobasidium*, AG-A and AG-F (Figure 5). Table 2 shows the identity and the accession numbers of the sequences obtained.

Pathogenicity tests: The appearance of symptoms in plants took place 14 days after inoculation, in

Identificación molecular y análisis filogenético de los hongos. Un primer análisis BLAST a partir de la región comprendida entre el espaciador transcrito interno I y II (ITS1-ITS2) de todos los aislados, permitió determinar que 25 secuencias tenían un 99-100% de similitud a *F. solani*; 5 a *F. brachygibbosum*, 2 a *F. oxysporum*, 10 a *Ceratobasidium* sp. y 3 secuencias a *Rhizoctonia solani* también con 99-100% de similitud con secuencias homólogas de NCBI.

El análisis filogenético bajo el criterio de MV para el género *Fusarium* se realizó con la matriz concatenada de las secuencias de los genes ITS, RPB2 y TEF1 de los 32 aislados de este estudio y de 25 cepas de referencia depositadas en colecciones de cultivos (Al-Hatmi *et al.*, 2016). El mejor modelo de sustitución de nucleótidos fue TIM2+I+G. Se consideraron 1816 nucleótidos en el conjunto de datos. El análisis multilocus permitió definir la identidad correcta de los aislados inicialmente propuestos como *F. solani*, ya que éstos forman un clado separado con 100 % de similitud con los aislados tipo de *F. falciforme*. Un integrante del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC). La identidad de *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum* fue corroborada (Figura 4).

Un análisis similar, se realizó con las secuencias de los aislados de *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium* sp. Se procesó una matriz integrada por las regiones ITS y RPB2 de 49 aislados, incluyendo los del presente estudio y 36 cepas de referencia (*Cantharellales*), obtenidas de colecciones de cultivos (González *et al.*, 2016). El mejor modelo de sustitución de nucleótidos fue GTR+I+G. Se consideraron 1355 nucleótidos de cada aislado en el conjunto de datos. Este análisis estableció la identidad de dos grupos anastomóticos para el género, AG-4 y AG-6 y dos para el género *Ceratobasidium*, AG-A y AG-F. (Figura 5). El Cuadro 2 muestra la identidad y los números de accesión de las secuencias obtenidas.

the form of lesions in the roots and the base of the stem. All the isolation and their combinations caused the death of the plants after 21 days. Table 3 shows the percentage of infected roots in each treatment. Control plants presented no symptoms.

DISCUSSION

Although Sonora is the main watermelon producing state in Mexico, there are no formal reports on the fungi related to rotting. The pathological data in this investigation show that, individually or in a group, at least five different fungal species caused root rot, which led to death of watermelon plants before they reached physiological maturity, during the formation and development of fruits. The characteristics of the colonies, morphology, nuclei staining and phylogenetic analysis of sequences helped to identify two species of the Ceratobasidiaceae family: *Rhizoctonia solani* and *Ceratobasidium* sp., and three of the *Fusarium* genus: *F. falciforme*, *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum*, showing that there is a diverse community of fungi causing root rot in watermelon planted in the Coast of Hermosillo and the Valley of Guaymas, Sonora.

The predominant species was found to be *F. falciforme*, with 25 isolations from three fields of the two sites sampled. Initially, this fungus was identified as the polytypic morphospecies *F. solani*. Based on the linked phylogenetic analysis of the regions ITS, TEF-1 α and RPB2 using ML, a separate clade is formed within the *Fusarium solani* Species Complex (FSSC). This complex groups at least 60 different species that, because of the similarity in the morphology of their conidia, are known as cryptic species. They have a wide range of hosts and have been subdivided into *formae speciales*, depending on the specificity of the host (O'Donnell *et al.*, 2015). Recent phylogenetic

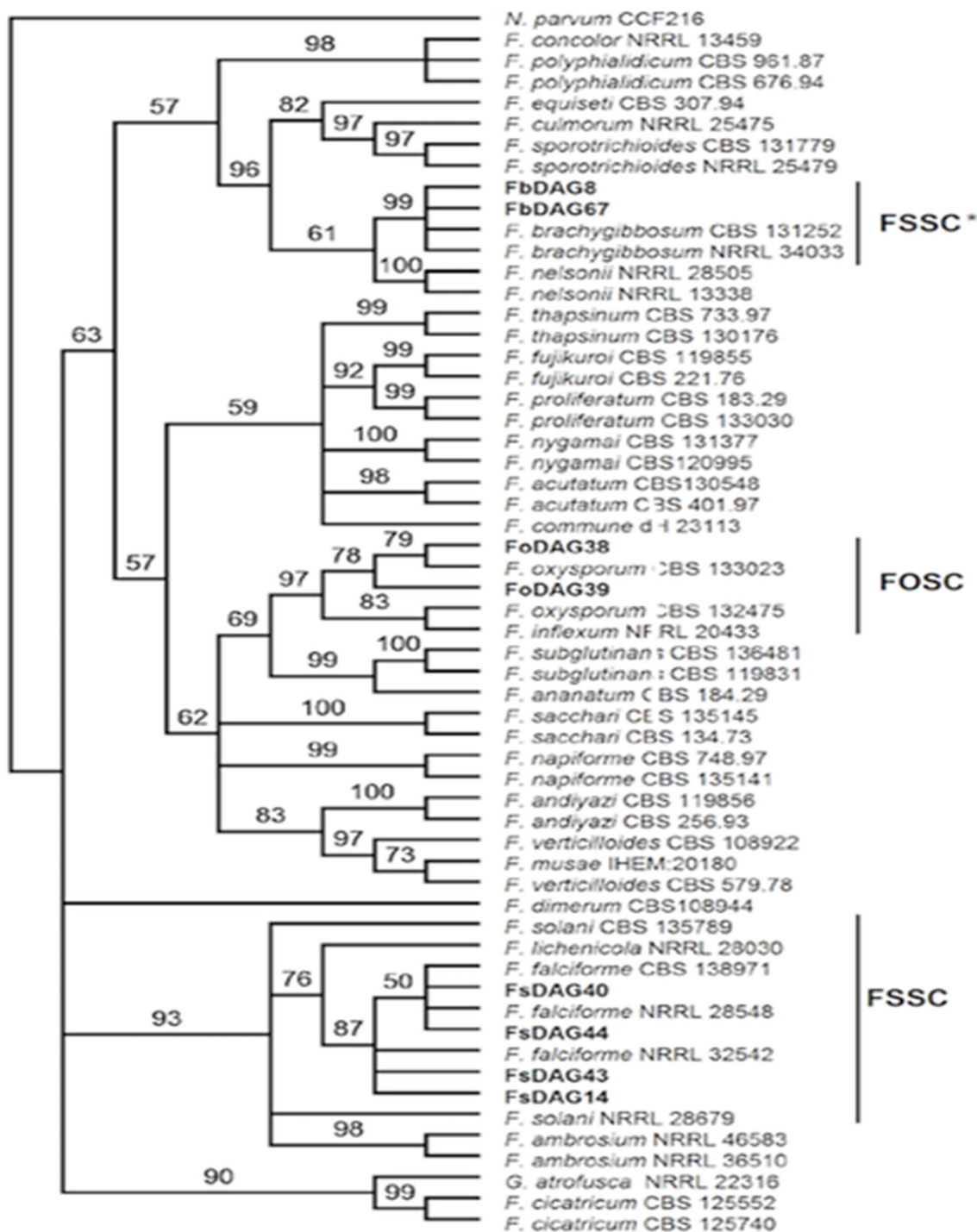


Figura 4. Filogenia por MV de las secuencias concatenadas de los genes ITS, EF y RPB2 de 8 aislados de *Fusarium* spp. (en negritas) representativos de 29 obtenidos de plantas de sandía con marchitez y pudrición de raíz. Bootstrap de 1000 réplicas; grupo externo: *Neofusicoccum parvum*.

Figure 4. Phylogeny by MV of the chained sequences of the genes ITS, EF and RPB2 of 8 *Fusarium* spp. isolations (in bold) representative of 29 obtained from watermelon plants with wilting and root rot. Bootstrap of 1000 replications; external group: *Neofusicoccum parvum*.

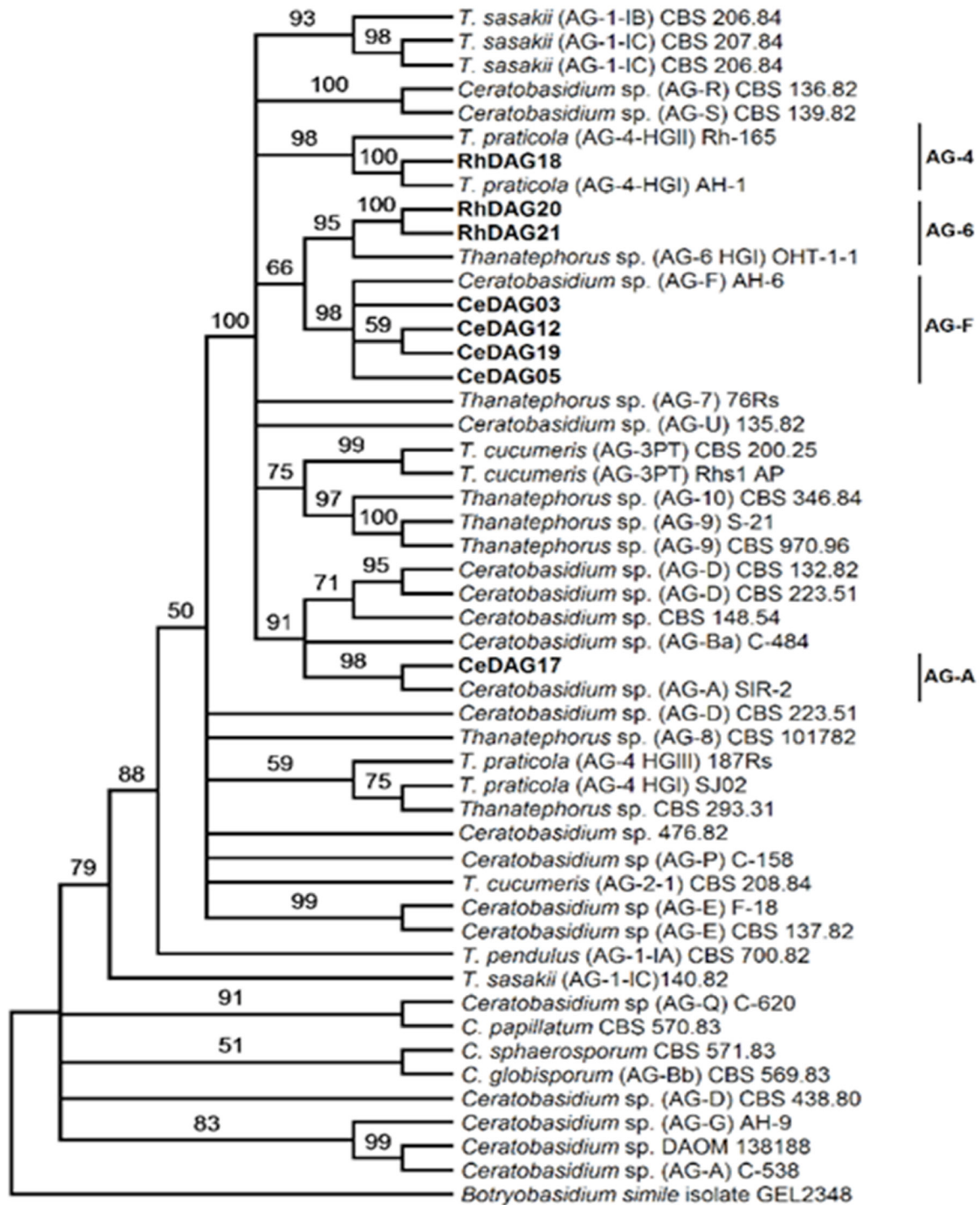


Figura 5. Filogenia por MV de las secuencias concatenadas de los genes ITS y RPB2 de 8 aislados de *Rhizoctonia* spp. (en negritas) representativos de 16 obtenidos de plantas de sandía con marchitez y pudrición de raíz. Bootstrap de 1000 réplicas; grupo externo: *Botrybasidium simile*. AG=Grupo anastomósico.

Figure 5. Phylogeny by MV of the chained sequences of the genes ITS, EF and RPB2 of 8 *Rhizoctonia* spp. isolations (in bold) representative of 16 obtained from watermelon plants with wilting and root rot. Bootstrap of 1000 replications; external group: *Botrybasidium simile*. AG=Anastomotic group.

Cuadro 2. Identidad, localización y números de accesoión de secuencias obtenidas en el presente estudio.
Table 2. Identity, location and accession numbers of sequences obtained in this study.

| Identidad | Nombre del aislado | Sitio | Número de accesoión en el GenBank | | |
|---|--------------------|-------|-----------------------------------|----------|----------|
| | | | ITS | EF | RPB2 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG10 | CH2 | KX583230 | KY514171 | MF939148 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG11 | CH1 | KX583231 | KY514185 | MF939149 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG14* | CH2 | KX583232 | KY514172 | KY637066 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG36 | CH2 | KX583233 | KY514173 | MF939150 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG43* | CH1 | KX583234 | MF939167 | KY637067 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG44* | CH1 | KX583235 | KY514176 | KY637068 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG45 | CH1 | KX583236 | KY514177 | MF939151 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG46 | CH1 | KX583237 | KY514187 | MF939152 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG48 | CH1 | KX583238 | KY514178 | MF939153 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG49 | CH1 | KX583239 | KY514179 | MF939154 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG50 | CH1 | KX583240 | KY514180 | MF939155 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG51 | CH1 | KX583241 | KY514181 | MF939156 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG52 | CH1 | KX583242 | KY514182 | MF939157 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG53 | CH1 | KX583243 | KY514183 | MF939158 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG54 | CH1 | KX583244 | KY514184 | MF939159 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG30 | CH1 | KX583245 | KY514186 | MF939160 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG37 | CH2 | KX583246 | KY514174 | MF939161 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG29 | CH1 | KX583247 | MF939168 | MF939162 |
| <i>F. falciforme</i> (FSSC) | FsDAG40* | VG1 | KX583248 | KY514175 | KY637065 |
| <i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) ^a | FbDAG41 | VG1 | KX583249 | MF939166 | MF939163 |
| <i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) ^a | FbDAG67* | CH1 | KX583250 | KY514170 | KY637062 |
| <i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) ^a | FbDAG8* | CH1 | KX583251 | KY514169 | KY637061 |
| <i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) ^a | FbDAG9 | CH2 | KX583252 | MF939165 | MF939164 |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. niveum (FOSC) | FoDAG38* | VG2 | KX583253 | KY514188 | KY637063 |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. niveum (FOSC) | FoDAG39* | VG1 | KX583254 | KY514189 | KY637064 |
| <i>Ceratobasisium</i> sp. AG-F | CeDAG3* | CH2 | MF804912 | | KY637071 |
| <i>Ceratobasisium</i> sp. AG-F | CeDAG5* | VG2 | KX583256 | - | KY637074 |
| <i>Ceratobasisium</i> sp. AG-F | CeDAG12* | CH2 | KX583257 | - | KY637072 |
| <i>Ceratobasisium</i> sp. AG-F | CeDAG19* | VG2 | KX583258 | - | KY637073 |
| <i>Ceratobasisium</i> sp. | CeDAG17 | CH1 | MF804910 | - | MF804913 |
| <i>Ceratobasisium</i> sp. | CeDAG22 | CH2 | KX583259 | - | - |
| <i>Ceratobasisium</i> sp. | CeDAG23 | CH2 | KX583260 | - | - |
| <i>T. praticola</i> = <i>R. solani</i> AG-4 | RhDAG18* | CH2 | MF804911 | - | MF804914 |
| <i>Thanatephorus</i> sp. | RhDAG20* | VG1 | KX583262 | - | KY637069 |
| <i>Thanatephorus</i> sp. | RhDAG21* | VG1 | KX583263 | - | KY637070 |

*= Aislados considerados en el análisis filogenético. FSSC= *Fusarium solani* Species Complex. FSSC^a= *Fusarium sambucinum* Species Complex. FOSSC= *Fusarium oxysporum* Species Complex. CH1= Costa de Hermosillo1, CH2= Costa de Hermosillo2, VG1= Valle de Guaymas1, VG2= Valle de Guaymas. AG=Grupo anastomósico. - = sin dato / *= Isolations considered in the phylogenetic analysis. FSSC= *Fusarium solani* Species Complex. FSSC^a= *Fusarium sambucinum* Species Complex. FOSSC= *Fusarium oxysporum* Species Complex. CH1= Coast of Hermosillo1, CH2= Coast of Hermosillo2, VG1= Valley of Guaymas1, VG2= Valley of Guaymas. AG= Anastomosis group. - = Without data.

Pruebas de patogenicidad: La aparición de síntomas en las plantas ocurrió después de 14 días de su inoculación, en forma de lesiones en la raíz y base del tallo. Todos los aislados y sus combinaciones

analyses have revealed that each *formae speciales* belongs to a biologically and phylogenetically different species (Coleman, 2016; O'Donnell *et al.*, 1998). *F. falciforme* has been reported as a causal

causaron la muerte de las plantas después de 21 días. El Cuadro 3 muestra el porcentaje de raíces infectadas en cada tratamiento. Las plantas testigo no presentaron síntomas.

DISCUSIÓN

Aun cuando el estado de Sonora es el principal productor de sandía en México, no se tienen reportes formales acerca de los hongos asociados a la pudrición de raíz. Los datos patológicos en esta investigación demuestran que individualmente o en conjunto, al menos cinco especies diferentes de hongos causan pudrición radicular y eventualmente la muerte de plantas de sandía antes de alcanzar su madurez fisiológica, al momento de la formación y desarrollo de frutos. Las características de las colonias, la morfología, la tinción de núcleos y el análisis filogenético de secuencias permitió identificar dos especies de la familia Ceratobasidiaceae: *Rhizoctonia solani* y *Ceratobasidium* sp. y tres del género *Fusarium*: *F. falciforme*, *F. oxysporum* y *F. brachygibbosum*, lo que demuestra que hay una comunidad diversa de hongos causando pudrición de raíz en sandía cultivada en la costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas, Sonora.

La especie predominantemente encontrada fue *F. falciforme*, con 25 aislados provenientes de tres campos de los dos sitios muestreados. Inicialmente, este hongo fue identificado como la morfoespecie polítípica *F. solani*. Con base en el análisis filogenético concatenado de las regiones ITS, TEF-1 α y RPB2 usando MV se forma un clado separado dentro del *Fusarium solani* Species Complex (FSSC). Este complejo agrupa por lo menos a 60 diferentes especies que, por similitud en la morfología de sus conidias, son llamadas especies crípticas. Cuentan con un amplio rango de hospederas y han sido subdivididas en *formae speciales*, dependiendo de la

Cuadro 3. Porcentaje de raíces infectadas en las pruebas de patogenicidad.

Table 3. Percentage of infected roots in the pathogenicity tests.

| Tratamiento | SS-7187
HQ F1 | Precious
Petit |
|--|------------------|-------------------|
| Testigo | 0 | 0 |
| <i>F. solani</i> | 23 | 66 |
| <i>F. oxysporum</i> | 71 | 75 |
| <i>F. brachygibbosum</i> | 87 | 100 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 54 | 84 |
| <i>Ceratobasidium</i> | 48 | 100 |
| <i>F. solani</i> + <i>F. brachygibbosum</i> | 55 | 100 |
| <i>F. oxysporum</i> + <i>F. brachygibbosum</i> | 55 | 100 |
| <i>R. solani</i> + <i>Ceratobasidium</i> | 71 | 100 |
| <i>F. solani</i> + <i>Ceratobasidium</i> | 40 | 80 |
| <i>F. oxysporum</i> + <i>Ceratobasidium</i> | 100 | 100 |

agent of wilting and root rot in lima bean plants and chickpea in Brazil (Sousa *et al.*, 2017, Cabral *et al.*, 2016).

Five *F. brachygibbosum* isolations belonging to *Fusarium sambucinum* Species Complex (FSSC) were identified in three sampling sites. The characteristics of the colonies coincide with the first description published (Padwick, 1945), they present abundant white to pink aerial mycelia white to amber sclerotia of up to 2.0 mm in diameter, oval or fusiform conidia, hyperbolically curved macroconidia, terminal or alternated chlamydospores, single or in chain, generally unicellular. As a preliminary product of this investigation, *F. brachygibbosum* was reported for the first time as a pathogenic agent, causing this wilting in watermelon seeds (Rentería-Martínez *et al.*, 2015). It has recently been recorded as a causal agent of rotting in the stem of maize plants (Shan *et al.*, 2017), wilting and regressive death in *Euphorbia larica* and olive trees (Al-Mahmooli *et al.*, 2013; Trabelsi *et al.*, 2017) and of rotting and cankers in almond and chestnut trees (Stack *et al.*, 2017; Marek *et al.*, 2013).

especificidad al hospedero (O'Donnell *et al.*, 2015). Análisis filogenéticos recientes han revelado que cada *formae speciale* corresponde a una especie, biológica y filogenéticamente distinta (Coleman, 2016; O'Donnell *et al.*, 1998). *F. falciforme* ha sido reportado como agente causal de marchitamiento y pudrición de raíz en frijol lima y garbanzo en Brasil (Sousa *et al.*, 2017, Cabral *et al.*, 2016).

Se identificaron cinco aislados de *F. brachygibbosum* perteneciente a *Fusarium sambucinum* Species Complex (FSSC) en tres sitios de muestreo. Las características de las colonias coinciden con la primera descripción publicada (Padwick, 1945), presenta micelio aéreo abundante de blanco a rosa, esclerocios de blanco a ámbar de hasta 2.0 mm de diámetro, conidias ovoides a fusiformes, macroconidias hiperbólicamente curvadas, clamidosporas terminales o intercaladas, sencillas o en cadenas, generalmente de una célula. Como producto preliminar de esta investigación, *F. brachygibbosum* fue reportado por primera vez como agente patógeno, causante de marchitez en plantas de sandía (Rentería-Martínez *et al.*, 2015). Recientemente se ha registrado como agente causal de podredumbre del tallo del maíz (Shan *et al.*, 2017), marchitez y muerte regresiva en *Euphorbia larica* y olivo (Al-Mahmooli *et al.*, 2013; Trabelsi *et al.*, 2017) y de podredumbre y canchales en almendro y nogal (Stack *et al.*, 2017; Marek *et al.*, 2013).

F. oxysporum f. sp. *niveum* perteneciente al *Fusarium oxysporum* Species Complex (FOSC), se aisló solamente de los campos ubicados en el Valle de Guaymas. Los miembros de FOSC causan marchitez vascular y pudrición radicular en más de 100 diferentes especies vegetales, y en base a su especificidad con el hospedero se han reportado más de 80 *formae speciale*. En ese sentido un diagnóstico certero, aún antes de que se presenten sus síntomas, es crucial para el manejo de los cultivos (López-Mondéjar *et al.*, 2012).

F. oxysporum f. sp. *niveum* belongs to the *Fusarium oxysporum* Species Complex (FOSC); it was only isolated from the fields located in the Valley of Guaymas. The components of FOSC cause vascular wilting and root rot in over 100 different plant species, and based on their specificity with the host, there have been reports of over 80 *formae speciale*. In this sense, an accurate diagnosis, even before symptoms appear, is crucial for the management of crops (López-Mondéjar *et al.*, 2012).

Regarding the Ceratobasidiaceae family, binuclear *Rhizoctonia* (teleomorph: *Ceratobasidium* sp.) was the species with the widest distribution, since it was isolated from all the fields sampled, and most frequently, in field No. 2 of the Coast of Hermosillo. The symptoms observed in roots and stems of infected plants were reddish-brown lesions located and slightly sunken in the base of the stem and 0.2 to 2.0 cm in length. In some cases, the discoloration presented by diseased plants affected almost 90 % of the root system (Meza-Möller *et al.*, 2014).

The phylogenetic analysis by ML showed that the isolations obtained from *Ceratobasidium* sp. belong to two different anastomotic groups: AG-A and AG-F, previously found in diseased *Ipomoea batatas* and *Arachis hypogaea* plants, respectively. The phylogenetic relations of *Rhizoctonia* fungi show consistency between the clades formed and the anastomotic groups to which they belong (González *et al.*, 2016).

It is important to point out that most of the *Ceratobasidium* sp. isolates found in this investigation belong to group AG-F, which coincides with earlier works on root rot in watermelon carried out in Arizona, U.S.A (Nischwitz *et al.*, 2013) and Italy (Aiello *et al.*, 2012). *Ceratobasidium* AG-F is also the causal agent of root rot in strawberry (Sharon *et al.*, 2007), *Tagetes erecta* (Saroj *et al.*,

En lo que respecta a la familia Ceratobasidiae, *Rhizoctonia* binucleada (teleomorfo: *Ceratobasidium* sp.) fue la especie de más amplia distribución, ya que se aisló de todos los campos muestreados, y más frecuentemente en el campo No. 2 de la Costa de Hermosillo. Los síntomas observados en raíces y tallos de plantas infectadas fueron lesiones localizadas café-rojizas y ligeramente hundidas en la base del tallo y de 0.2 a 2.0 cm de largo. En algunos casos, la decoloración presentada por las plantas enfermas afectó casi el 90 % de sistema radicular (Meza-Möller *et al.*, 2014).

El análisis filogenético mediante MV mostró que los aislados obtenidos de *Ceratobasidium* sp., corresponden a dos grupos anastomósicos distintos: AG-A y AG-F, previamente registrados en plantas enfermas de *Ipomoea batatas* y *Arachis hypogaea*, respectivamente. Se ha demostrado que las relaciones filogenéticas de hongos de *Rhizoctonia* demuestran consistencia entre los clados formados y los grupos anastomósicos a los que pertenecen (González *et al.*, 2016).

Es importante señalar que la mayoría de los aislados de *Ceratobasidium* sp. encontrados en esta investigación pertenecen al grupo AG-F, lo que coincide con trabajos previos sobre pudrición radicular en sandía realizados en Arizona, EUA (Nischwitz *et al.*, 2013) e Italia (Aiello *et al.*, 2012). *Ceratobasidium* AG-F también es el agente causal de pudrición radicular en fresa (Sharon *et al.*, 2007), *Tagetes erecta* (Saroj *et al.*, 2013) y pistache (Alaei *et al.*, 2017).

No existe información previa acerca de la patogenicidad del grupo anastomósico AG-A en sandía, pero sí en remolacha azucarera y manzano (Wang y Wu, 2012).

Los aislados de menor frecuencia fueron los pertenecientes al género *Rhizoctonia*, que por la alta variabilidad en su distribución geográfica, morfología, especificidad de hospederas, y

2013) and pistachio (Alaei *et al.*, 2017).

There is no previous information on the pathogenicity of the anastomotic group AG-A in watermelon, but there is on sugar beet and apple trees (Wang and Wu, 2012).

The least frequent isolations belong to the genus *Rhizoctonia*, which, due to the high variability in its geographic distribution, morphology, specificity of hosts, and pathogenicity, has also been proposed as a species complex (González *et al.*, 2006). Isolation RhDAG18 obtained from site CH2 belongs to AG-4 and has been morphologically delimited as *Thanatephorus praticola* (Mordue *et al.*, 1989), which was later corroborated by the multilocus phylogenetic analysis (González *et al.*, 2016). *T. praticola* has been presented in association with *Ceratobasidium* sp. AG-F as part of a fungal complex that cause root rot and deterioration in watermelon plantations in the production stage in Italy (Aiello *et al.*, 2012).

The pathogenicity tests showed that isolated fungi are causal agents of root rot in watermelon plants. The results of the percentage of infected roots showed that both watermelon varieties evaluated are susceptible to the five pathogens identified, inoculated separately or in combinations. In this regard, Aiello *et al.* (2012) detected percentages of incidence of the disease higher than 81 % when evaluating 6 different isolations of *Ceratobasidium* from the anastomotic group AG-F.

Due to economic losses resulting from root diseases in the areas of study, direct planting in the soil has been replaced almost entirely with watermelon grafted on patterns resistant to root rot. The commonly used rootstocks in the region are hybrids between *Cucurbita maxima* x *C. moschata*, although these hybrids have shown susceptibility to root rot (López-Elías *et al.*, 2010). Some rootstocks have shown to be susceptible to *Fusarium* in Spain, the main producer of cucurbits in Europe

patogenicidad se ha propuesto también como un complejo de especies (González *et al.*, 2006). El aislado RhDAG18 obtenido del sitio CH2 pertenece al AG-4 y ha sido delimitado morfológicamente como *Thanatephorus praticola* (Mordue *et al.*, 1989), lo que fue corroborado posteriormente por el análisis filogenético multilocus (González *et al.*, 2016). *T. praticola* se ha presentado en asociación con *Ceratobasidium* sp. AG-F como parte de un complejo de hongos que causan pudrición de raíz y declive de plantaciones de sandía en etapa de producción en Italia (Aiello *et al.*, 2012).

Las pruebas de patogenicidad demostraron que los hongos aislados son agentes causales de pudrición radicular en sandía. Los resultados del porcentaje de raíces infectadas evidenciaron que las dos variedades de sandía evaluadas son susceptibles a los cinco patógenos identificados, inoculados por separado o en combinaciones. A este respecto, Aiello *et al.* (2012) detectaron porcentajes de incidencia de la enfermedad superiores a 81 %, al evaluar 6 diferentes aislados de *Ceratobasidium* del grupo anastomósico AG-F.

Debido a las pérdidas económicas derivadas de enfermedades radiculares en las regiones estudiadas, la siembra directa en suelo ha sido sustituida casi en su totalidad por sandía injertada sobre patrones resistentes a pudrición de raíz. Los portainjertos comúnmente empleados en la región son híbridos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*, sin embargo, estos híbridos ya han mostrado susceptibilidad a pudrición de raíz (López-Elías *et al.*, 2010). Algunos portainjertos han mostrado susceptibilidad a *Fusarium* en España, principal productor de cucurbitáceas en Europa (Armengol *et al.*, 2000). Por otro lado, la aparente resistencia a marchitez por *Fusarium* de algunas variedades comerciales de sandía, es dependiente del tipo y concentración inicial del inóculo (Martyn y McLaughlin, 1983); en ese sentido, la oportuna identificación del

(Armengol *et al.*, 2000). On the other hand, the apparent resistance to wilting by *Fusarium* of some commercial varieties of watermelon depends on the type and initial concentration of the inoculant (Martyn and McLaughlin, 1983); in this sense, the timely identification of the pathogen will help make a better choice of rootstock. Additionally, once the pathogenic species present has been accurately established, the quantification of its concentration will manage the disease better. Using the quantitative PCR (qPCR) technique, it is possible to detect up to one 1 pg of fungal DNA in plants without symptoms (Haegi *et al.*, 2013).

CONCLUSIONS

In the present study, *Fusarium falciforme* and *Thanatephorus praticola* are reported for the first time as causal agents of watermelon plants root rotting in Mexico. The Multilocus analysis corroborated *Fusarium brachygibbosum* and *Ceratobasidium* sp. identity, previously reported in the literature. This research is a first attempt at generating data that could lead to broader studies that may contribute to establish adequate control strategies for disease management in commercial watermelon plantations.

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

patógeno permitirá una mejor elección del portainjerto. Adicionalmente, una vez determinada con precisión la especie patogénica presente, la cuantificación de su concentración, permitiría un mejor manejo de la enfermedad. Mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), es posible detectar hasta 1 pg de ADN fúngico en plantas asintomáticas (Haegi *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se reporta por primera vez a *Fusarium falciforme* y *Thanatephorus praticola* como causantes de pudrición radicular en plantas de sandía en México. El análisis multilocus permitió corroborar también a *Fusarium brachygibbosum* y *Ceratobasidium* sp., previamente reportados. Esta investigación, representa un primer intento para generar información que conduzca a estudios más amplios, que permitan establecer estrategias adecuadas para el manejo de la enfermedad en plantaciones comerciales de sandía.

## LITERATURA CITADA

- Aiello D, Vitale A, Hyakumachi M and Polizzi G. 2012. Molecular characterization and pathogenicity of binucleate *Rhizoctonia* AG-F associated to the watermelon vine decline in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 134:161-165. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9973-9>
- Alaei H, Molaei S, Mahmoodi SB and Saber-Riseh R. 2017. New Anastomosis Group F (AG-F) of binucleate *Rhizoctonia* causing root and stem rot of *Pistacia vera*. *Journal of Crop Protection* 6:1-13. <https://doi.org/10.18869/modares.jep.6.1.1>
- Al-Hatmi AM, Van Den Ende AH, Stielow JB, Van Diepeningen AD, Seifert KA, McCormick W, Assabqui R, Gräfenhan T, De Hoog GS and Levesque CA. 2016. Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in *Fusarium*. *Fungal Biology* 120:231-245. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.006>
- Al-Mahmooli IH, Al-Bahri YS, Al-Sadi AM and Deadman ML. 2013. First Report of *Euphorbia larica* Dieback Caused by *Fusarium brachygibbosum* in Oman. *Plant Disease* 97:687. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0828-PDN>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers 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)
- Armengol J, José CM, Moya MJ, Vicent A and García JJ. 2000. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. *EPPO Bulletin* 30:179-183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00875.x>
- Cabral CS, Melo MP, Fonseca MEN, Boiteux LS and Reis A. 2016. A Root Rot of Chickpea caused by Isolates of the *Fusarium solani* Species Complex in Brazil. *Plant Disease* 100:2171. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0571-PDN>
- Carling DE, Kuninaga S and Brainard KA. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 (AG2) and AG-BI. *Phytopathology* 92:43-50. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.43>
- Cedeño L. 2008. Método fácil y confiable para teñir núcleos en hongos del complejo *Rhizoctonia*. *Bioagro* 20:215-219. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714153009> (Consulta, agosto 2017).
- Choi J, Park SY, Kim BR, Roh JH, Oh IS, Han SS and Lee YH. 2013. Comparative Analysis of Pathogenicity and Phylogenetic Relationship in *Magnaporthe grisea* Species Complex. *PLOS ONE* 8: e57196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057196>
- Coleman JJ. 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology* 17:146-158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Food and Agriculture Organization. 2014. Estadísticas. Disponible en línea: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> (Consulta, junio 2017).
- Geiser DM, Aoki T, Bacon CW, Baker SE, Bhattacharyya MK, Brandt ME, Brown DW, Burgess LW, Chulze S, Coleman JJ, Correll JC, Covert SF, Crous PW, Cuomo CA, De Hoog GS, Di Pietro A, Elmer WH, Epstein L, Frandsen RJ, Freeman S, Gagkaeva T, Glenn AE, Gordon TR, Gregory NF, Hammond-Kosack KE, Hanson LE, Jiménez-Gasco M M, Kang S, Kistler HC, Kuldau GA, Leslie JF, Logrieco A, Lu G, Lysøe E, Ma LJ, McCormick SP, Migheli Q, Moretti A, Munaut F, O'Donnell K, Pfenning L, Ploetz RC, Proctor RH, Rehner SA, Robert VA, Rooney AP, Bin Salleh B, Scandiani MM, Scauflaire J, Short DP, Steenkamp E, Suga H, Summerell BA, Sutton DA, Thrane U, Trail F, Van Diepeningen A, Vanetten HD, Viljoen A, Waalwijk C, Ward TJ, Wingfield MJ, Xu JR, Yang XB, Yli-Mattila T and Zhang N. 2013. One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103:400-408. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE>
- González D, Rodríguez CM, Boekhout T, Stalpers J, Kura-mae EE, Nakatani AK, Vilgalys R and Cubeta MA. 2016. Phylogenetic relationships of *Rhizoctonia* fungi within the Cantharellales. *Fungal Biology* 120:603-19. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.012>
- González D. 2013. Identification, molecular characterization, and evolution of group I introns at the expansion segment D11 of 28S rDNA in *Rhizoctonia* species. *Fungal Biology* 117: 623-637. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.06.006>
- González D, Cubeta MA and Vilgalys R. 2006. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and b-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:459-470. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.03.022>
- Haegi A, Catalano V, Luongo L, Vitale S, Scotton M, Ficcadenti N and Belisario A. 2013. A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible

- interactions with grafted melon genotypes. *Phytopathology* 103:802-810. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-12-0293-R>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ed. Wiley-Blackwell. USA. 388p.
- López EJ, Pacheco-Ayala F, Huez-López MA, Rodríguez JC, Jiménez-León J y Garza-Ortega S. 2010. Sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) injertada sobre diferentes portainjertos de calabaza (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). *Biocencia*. XII: 3-10. Disponible en línea: <https://biocencia.unison.mx/index.php/biocencia/article/view/87>
- López-Mondéjar R, Beaulieu R, Ros M and Pascual JA. 2012. SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. *Crop protection* 33:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.10.009>
- Marek SM, Yagmour MA and Bostock RM. 2013. *Fusarium* spp., *Cylindrocarpon* spp., and environmental stress in the etiology of a canker disease of cold-stored fruit and nut tree seedlings in California. *Plant Disease* 97: 259-270. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0355-RE>
- Martyn RD and McLaughlin RJ. 1983. Effects of inoculum concentration on the apparent resistance of watermelons to *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. *Plant Disease* 67:493-495. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05\\_493.PDF](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05_493.PDF)
- Meza-Möller AC, Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho M, Romo-Tamayo F, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF. 2014. First report of root rot of watermelon caused by *Ceratobasidium* sp. in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 98:847. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0974-PDN>
- Mordue JEM, Currah RS and Bridge PD. 1989. An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques. *Micological Research* 92:78-90. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80099-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80099-1)
- Narayanasamy P. 2011. Assessment of variability in fungal plant pathogens. Pp:245-272 *In: Microbial plant pathogens detection and disease diagnosis*. Vol. 1. Springer. Dordrecht, Netherlands. 291p. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4_4)
- Nischwitz C, Chitrampalam P and Olsen M. 2013. *Ceratobasidium* root rot: A new disease of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Arizona. *Plant Health Progress*. DOI:10.1094/PHP-2013-1125-01-BR
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:2044-2049. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19243/>
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJ N, Lysoe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S and Geiser DM. 2013. Phylogenetic analysis of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52:20-31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- O'Donnell K, Ward TJ, Robert VARG, Crous PW, Geiser DM and Kang, S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica* 43:583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Padwick GW. 1945. Notes on Indian fungi III. *Mycological Papers*. 12:1-15
- Posada D and Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.817>
- Rentería-Martínez ME, Meza-Moller AC, Guerra-Camacho M, Romo-Tamayo F, Ochoa-Meza A and Moreno-Salazar SF. 2015. First report of watermelon wilting caused by *Fusarium brachygibbosum* in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 99:729. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1073-PDN>
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [2015-09-10]. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index)
- Saroj A, Kumar A, Saeed ST, Samad A and Alam M. 2013. First report of *Tagetes erecta* damping off caused by *Ceratobasidium* sp. from India. *Plant Disease* 97:1251. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0145-PDN>
- Shan LY, Cui WY, Zhang DD, Zhang J, Ma NN, Bao YM, Dai XF and Guo W. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. *Plant Disease* 101:837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1465-PDN>
- Sharon M, Freeman S, Kuninaga S. and Sneha B. 2007. Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 117:247-265. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9091-7>
- Sharon M, Kuninaga S, Hyakumachi M, Naito S and Sneha B. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49:93-114. <https://doi.org/10.1007/s10267-007-0394-0>
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción agrícola por cultivo. [2017-02-14]. <http://www.siap.gob.mx/>
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD and Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sousa ES, Melo MP, Mota JM, Sousa EMJ, Beserra JEA and Matos KS. 2017. First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) causing root rot in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. *Plant Disease* 101:1954. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0657-PDN>
- Sneha B, Jabaji-Hare S, Neate S, and Dijkstra G. 1996. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherlands. 578p.
- Stack AJ, Yagmour MA, Kirkpatrick SC, Gordon TR and Bostock RM. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing cankers in cold-stored, bare-root propagated



- almond trees in California. *Plant Disease* 101:390. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0929-PDN>
- Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Iriny L, Smits D and Robert V. 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35:242-263. <http://doi.org/10.3767/003158515X689135>
- Swofford DL. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponible en línea: [http://paup.scs.fsu.edu/Command\\_ref\\_v2.pdf](http://paup.scs.fsu.edu/Command_ref_v2.pdf)
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS and Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics Biology* 31:21-32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>
- Trabelsi R, Sellami H, Gharbi Y, Krid S, Cheffi M, Kammoun S, Dammak M, Mseddi A, Gdoura R and Ali TM. 2017. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *3 Biotech* 7:28. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0587-3>
- Wang PP and Wu XH. 2012. First report of sugar beet seedling damping-off caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China. *Plant Disease* 96:1696. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0492-PDN>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, CA, USA. 345p.

# Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*

## Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*

Rocío Jiménez-Delgadillo, Silvia Edith Valdés-Rodríguez, Víctor Olalde-Portugal\*, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Unidad Irapuato Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, CP. 36821, Irapuato, Guanajuato, México; Rosario Abraham-Juárez, Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato-Salamanca. Universidad de Guanajuato, Km9 carretera Irapuato-Silao, CP. 36500, Irapuato, Guanajuato, México; José Luis García-Hernández, Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Ej. Venecia, Gómez Palacio, CP. 35000, Durango, México. \*Autor para correspondencia: v\_olalde@yahoo.com.mx.

Recibido: 15 de Noviembre, 2017. Aceptado: 30 de Abril, 2018.

Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R, García-Hernández JL. 2018. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2) 256-275.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-3

Primera publicación DOI: 05 de Mayo, 2018.

First DOI publication: May 05, 2018.

**Resumen.** En este estudio, se evaluaron los efectos de las condiciones ambientales (pH y temperatura) sobre la tasa de crecimiento y el efecto inhibitorio de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. Las cepas de *B. subtilis* se cultivaron en caldo de infusión de papa. Se analizaron el comportamiento fisiológico y la tasa de crecimiento (dN / dt) de las cepas bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. Las cepas mostraron un comportamiento diferente, lo que permitió establecer las condiciones óptimas y subóptimas

**Abstract.** In this study, the effects of environmental conditions (pH and temperature) on the growth rate and the inhibitory effect of different strains of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani* were evaluated. Strains of *B. subtilis* were grown in potato infusion broth. The physiological behavior and the growth rate (dN / dt) of the strains were analyzed under different pH and temperature conditions. The strains behaved differently, which allowed establishing optimum and suboptimal growth conditions for each strain. Cell-free supernatants obtained under different growth conditions were used in a quantitative test of in vitro antagonist activity against *R. solani*. This study showed that the inhibitory effect of the strains occurs mainly in the stationary phase.

**Key words:** biocontrol, growth rate, antagonism, physiological state

The genus *Bacillus* includes a variety of industrially important species that are commonly

de crecimiento para cada cepa. Los sobrenadantes exentos de células obtenidos en diferentes condiciones de crecimiento se usaron en una prueba cuantitativa de actividad antagonista *in vitro* frente a *R. solani*. Se demostró que el efecto inhibitorio de las cepas se presenta principalmente en la fase estacionaria.

**Palabras clave:** biocontrol, tasa de crecimiento, antagonismo, estado fisiológico.

El género *Bacillus* comprende diversas especies de importancia industrial que por lo general se utilizan en la industria de la fermentación (Veith *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2004; Fujinami y Fujisawa, 2010). Al igual que muchas de las especies del género *Bacillus*, *Bacillus subtilis* es una bacteria muy común, pues se encuentra en el suelo, el agua, el aire y en materia vegetal en descomposición (Ashlee *et al.*, 2008). Las bacterias del género *Bacillus* forman esporas, es decir, forman una pared gruesa que rodea su ADN y otras estructuras celulares internas. Esta característica las hace resistentes e inmunes a temperaturas extremas, químicos, factores ambientales e incluso algunos tipos de radiación, y, por tanto, se pueden utilizar en procesos industriales. Las bacterias tienen gran capacidad de mutación genética y, por ello, se utilizan en experimentos en el laboratorio (Ashlee *et al.*, 2008; Schallmeyer *et al.*, 2004). Al igual que la mayoría de sus parientes más cercanos, *B. subtilis* es no patogénico, se puede cultivar y manipular genéticamente con relativa facilidad y es eficaz en la secreción de proteínas y metabolitos (Matarante *et al.*, 2004). Además, muchas bacterias grampositivas que viven en complejas comunidades ecológicas, como las que se encuentran en ambientes terrestres y acuáticos, producen una gran variedad de compuestos especiales que son valiosos por sus propiedades farmacológicas

used in the fermentation industry (Veith *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2004; Fujinami y Fujisawa, 2010) *Bacillus subtilis*, as with many in the *Bacillus* genus, is an extremely common bacterium. It is found in soil, water, air, and decomposing plant matter (Ashlee, *et al.*, 2008.). Bacteria in the *Bacillus* genus are spore-forming, which means that they create a thick wall which surrounds their DNA and other internal cell structures. In this way, they are hardy and impervious to extreme temperatures, chemicals, environmental factors, even some types of radiation. As a consequence, they can be use in industrial processes. Bacteria are highly responsive to genetic mutation, resulting in experimental uses in a laboratory setting (Ashlee *et al.*, 2008; Schallmeyer *et al.*, 2004). Like most of its closest relative *B. subtilis* is non-pathogenic, the relative ease of cultivation and genetic manipulation, and the efficient secretion of proteins and metabolites (Matarante *et al.*, 2004). Furthermore, many gram-positive bacteria that inhabit complex ecological communities, such as those within soil and aquatic environments, produce a great variety of special compounds that are valuable for their pharmacological and antimetabolic properties. *Bacillus subtilis* is used to produce many antibiotics, such as difficidin, oxydifficidin, subtilosin A, bacillomycin B, and bacitracin, bacilysoicin which is helpful in treating bacterial skin infections and preventing infection in minor cuts and burns (Shelburne *et al.*, 2007; Stein 2005; Tamehiro *et al.*, 2002) *Bacillus subtilis* is also used as a fungicide (Savluchinske *et al.*, 2004). The bacteria colonize the root system, leaving no room for fungal diseases organisms; it is used on agricultural seeds of vegetables, its multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent (Bais *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Leclère *et al.*, 2005; Nagórska

y antimetabólicas. *Bacillus subtilis* se utiliza en la producción de numerosos antibióticos, como diflicidina, oxidiflicidina, subtilisina A, bacilomicina B y bacitracina, así como bacilisocina, auxiliar en el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por bacterias, y evita infecciones en cortaduras y quemaduras leves (Shelburne *et al.*, 2007; Stein, 2005; Tamehiro *et al.*, 2002). *Bacillus subtilis* se utiliza también como fungicida (Savluchinske *et al.*, 2004). Las bacterias colonizan el sistema radicular de las plantas y no permiten que se desarrollen organismos causantes de enfermedades fúngicas; en la agricultura se utiliza en semilla de verduras, ya que su comportamiento multicelular y la producción de una gran variedad de sustancias tóxicas respaldan el uso de *Bacillus subtilis* como un potente agente de biocontrol (Bais *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Leclère *et al.*, 2005; Nagórska *et al.*, 2007). La producción de estos metabolitos sería decisiva en la formulación de estrategias para su adaptación al ambiente terrestre que ocupa la planta, lo cual contribuiría a la supervivencia del organismo en sistemas ecológicos complejos. Estos bacilos genéticamente diversos muestran resultados prometedores que justificarían promover su desarrollo en varios cultivos para el control biológico de diversos fitopatógenos (Bapat y Shah, 2000; Bernal *et al.*, 2002; Kim, 2010). Desafortunadamente, la variabilidad en el comportamiento inherente de muchos agentes de biocontrol entre los sitios en el campo y los ciclos de cultivo ha impedido el desarrollo comercial de agentes biológicos de uso agrícola (Pal y Gardener, 2006). Mucha de esta variabilidad ha sido atribuida a las diferencias entre las propiedades de los hábitats naturales de los agentes de biocontrol y los lugares donde éstos son aplicados (O'Callaghan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Conocer los factores ambientales que regulan la biosíntesis de los compuestos antimicrobianos por las cepas de *Bacillus* es un paso fundamental para

*et al.*, 2007). The production of these metabolites may be crucial to develop strategies to adapt themselves to the soil environment occupied by the plant, which contributes to the survival of the organism in complex ecological systems. The genetically diverse bacilli show promising results for the promotion of growth on several crops and the biological control of various plant pathogens (Bapat y Shah 2000; Bernal *et al.* 2002; Kim 2010). Unfortunately, the inherent variable performance of most biocontrol agents between field locations and cropping seasons has hampered the commercial development of biological agents for use in agriculture (Pal y Gardener, 2006). Most of this variability has been attributed to differences between properties of the natural habitats of biocontrol agents and the places where they are applied (O'Callaghan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Understanding the environmental factors that regulate the biosynthesis of antimicrobial compounds by strains of *Bacillus* is an essential step in improving their antagonistic activities, which have not been adequately described (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). Physiological studies are necessary to develop and optimize the use of biocontrol agents as plant protectants. It is important to establish the relationship between proliferation and status of the bacteria, as well as the influence of environmental factors that modulate the biosynthesis of antifungal compounds. Other factors that must be considered are the type and concentration of carbon and nitrogen sources, oxygen tension, osmotic pressure, pH, temperature, and water availability (Kamney, 2008). These studies will provide essential information for the selection of new strains and products for the biological control of plant pathogens. In the current study, the effects of pH and temperature on antagonistic activity of different strains of *Bacillus subtilis* were evaluated, while keeping in mind the physiological stage of development.



mejorar sus actividades antagonicas, las cuales no han sido adecuadamente descritas (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). Es necesario realizar estudios fisiológicos para crear y optimizar el uso de agentes de biocontrol como protectores de plantas. Es importante establecer la relación entre la proliferación y las condiciones de las bacterias, así como la influencia de los factores ambientales que modulan la biosíntesis de los compuestos antifúngicos. Otros factores que se deben considerar son el tipo y la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, la tensión de oxígeno, la presión osmótica, el pH, la temperatura y la disponibilidad de agua (Kamney, 2008). Estos estudios proporcionarían información básica para seleccionar nuevas cepas y nuevos productos para el control biológico de los fitopatógenos. En el presente estudio se evaluaron los efectos de la temperatura y el pH en la actividad antagonista de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* y, al mismo tiempo, se consideró la fase fisiológica del desarrollo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas microbianas, medios y condiciones de cultivo

*Rhizoctonia solani* se obtuvo de la colección del laboratorio de bioquímica del Cinvestav-Irapuato. La cepa se cultivó principalmente en caldo de infusión de papa (Johnson y Curl, 1972). Las cepas BEB-8 y BEB-13 de *Bacillus subtilis* fueron aisladas de la rizosfera de un campo de papas en el estado de Guanajuato, México. La supuesta identificación se realizó con Microplacas Biolog GP2 (Biolog, Hayward, CA, EE UU). Las microplacas fueron inoculadas siguiendo las instrucciones de fabricante. La cepa PY-79 de *Bacillus subtilis* (Laboratorio de Bacteriología Molecular; Cinvestav-

## MATERIALS AND METHODS

### Microbial strains, culture media and conditions

*Rhizoctonia solani*, was obtained from the ecological biochemistry laboratory collection at Cinvestav-Irapuato. This strain was primarily grown on potato-infusion broth (Johnson y Curl, 1972). The strain BEB-8 and BEB-13 of *Bacillus subtilis* were isolated from the rhizosphere of a potato field in the state of Guanajuato, México. Putative identification was made using Biolog GP2 MicroPlates (Biolog, Hayward, CA, USA). The microplates were inoculated according to the manufacturer's instructions. The *Bacillus subtilis* PY-79 strain (Molecular Bacteriology Laboratory; Cinvestav-Irapuato) was used as a negative control for antagonistic activity; while *Bacillus subtilis* Kodiak (GBO3) obtained as a dry spore formulation (Bayer Crop Science Kansas City, MO US) was used as a positive control for biological activity. For long-term storage, bacterial cultures were maintained at -80 °C in potato-infusion agar containing 20% glycerol.

### Bacterial growth rate

Growth rate studies were carried out in flasks containing 100 mL of potato-infusion broth. Pre-inoculum densities were adjusted to an initial population density of  $10^5$  cfu/mL. An inoculum (1% v/v) of the different strains of *Bacillus subtilis* was added to the liquid medium and incubated at 28 °C, with continuous stirring at 120 rpm; the optimal density was monitored at 535 nm on a 50 Cary Spectronic spectrophotometer (Varian, Australia Pty Lid) every hour for up to 18 h. The bacterial concentration (cfu/mL) was estimated in plates containing the potato infusion with 1.5% (w/v) agar (BD, Bioxon, Becton-Dickinson), using

Irapuato) se utilizó como control negativo en la actividad antagonista, en tanto que la cepa Kodiak (GBO3) de *Bacillus subtilis*, que se obtuvo como una formulación de esporas secas (Bayer Crop Science Kansas City, MO, EE UU), se utilizó como control positivo en la actividad biológica. Para su almacenamiento prolongado, los cultivos de bacterias se mantuvieron a -80 °C en agar infusión de papa con glicerol al 20%.

### Tasa de crecimiento bacteriano

Los estudios de la tasa de crecimiento se realizaron en frascos con 100 mL de caldo de infusión de papa. Antes de aplicar el inóculo, las densidades de población se ajustaron a una densidad inicial de  $10^5$  cfu /mL. Se agregó inóculo (1% v/v) de las diferentes cepas de *Bacillus subtilis* al medio líquido y se incubaron a 28 °C, moviendo constantemente a 120 rpm; la densidad óptima se monitoreó a 535 nm en un espectrofotómetro Cary Spectronic 50 (Varian, Australia Pty Ltd) cada hora durante 18 h. La concentración bacteriana (cfu/ mL) se estimó en placas que contenían infusión de papa con agar al 1.5% (w/v) (BD, Bioxon, Becton-Dickinson) en un Giraplasca Automático en Espiral 4000 (Spiral Biotech, Inc., EE UU). Los parámetros cinéticos y el momento en que ocurrieron las fases del crecimiento se obtuvieron aplicando el modelo Verhulst-Pearl (Slater, 1985) o el modelo logístico, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$N = \frac{K}{1 + \exp^{a - \mu * t}}$$

En este modelo se utiliza un factor de correlación no lineal que es calculado estadísticamente por el programa SYSTAT (Inc. Programa para Windows V11.0).

an Automated Spiral Plater 4000 (Spiral Biotech, Inc. USA). The kinetic parameters and the time of occurrence of the phases of growth were obtained by the Verhulst-Pearl (Slater, 1985) or the logistic model, according to the following equation:

$$N = \frac{K}{1 + \exp^{a - \mu * t}}$$

This model employs a non-linear correlation factor statistically calculated by the SYSTAT software (Inc. program for Windows V11.0).

### Physiological studies

#### Effect of pH and temperature

To study the influence of pH and temperature on bacterial growth, the pH of potato-infusion broth was adjusted to 5, 6, 7 and 8, with HCl 1M. The cultures initiated with a 1% v/v inoculum were incubated at 15 °C, 28 °C and 37°C with continuous agitation at 120 rpm for 18 h. Bacterial growth was determined as described above. All analyses were carried out in triplicate. The optimal conditions for the maximum growth rate ( $dN/dt_{max}$ ) were determined using the statistical program S-Plus 4.0 for Windows.

#### Effect of the physiological state on antagonistic activity

Under optimal growth conditions ( $dN/dt_{max}$ ), potato-infusion broth inoculated with 3% (v/v) of a cellular suspension ( $N_0$ ) was incubated at the pre-determined pH and temperature with continuous agitation at 120 rpm for the time required to reach the desired phase of growth. The cells were collected by centrifugation at 10,000 g for 20 min 0 °C (J2-MC Centrifuge Beckman Germany) at all stages of growth. The sterilized (at 115 °C for

## Estudios fisiológicos

### Efecto del pH y la temperatura

Con el fin de estudiar la influencia del pH y la temperatura en el crecimiento bacteriano, el pH del caldo de infusión de papa se ajustó a 5, 6, 7 y 8 con 1M de HCl. Los cultivos iniciados con inóculo al 1% v/v fueron incubados a 15 °C, 28 °C y 37 °C, agitando constantemente a 120 rpm durante 18 h. El crecimiento bacteriano se determinó como se indicó anteriormente. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Las condiciones óptimas para lograr la tasa de máximo crecimiento ( $dN/dt_{max}$ ) se determinaron utilizando el programa estadístico S-Plus 4.0 para Windows.

### Efecto del estado fisiológico en la actividad antagonista

En condiciones óptimas de desarrollo ( $dN/dt_{max}$ ), el caldo de infusión de papa inoculado con (v/v) suspensión celular al 3% ( $N_0$ ) fue incubado a rangos de pH y temperatura predeterminados con agitación constante a 120 rpm durante el tiempo requerido para alcanzar la fase de crecimiento deseada. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 10,000 g durante 20 min 0 °C (J2-MC Centrifuge Beckman, Alemania) en todas las etapas de crecimiento. El sobrenadante esterilizado (a 115 °C por 15 min) y libre de células (CFS) de cada tratamiento se utilizó en la prueba cuantitativa de la actividad antagonista. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### Prueba cuantitativa de la actividad antagonista

La actividad antimicrobiana fue determinada *in vitro* midiendo la inhibición del crecimiento micelial en un medio de agar de infusión de papa con el CFS obtenido. El agar de infusión de papa fundido fue enfriado a 45 °C y suplementado de manera homogénea con 3 mL de CFS de cada cultivo de

15 min) cell-free supernatant (CFS) of each of the treatments was used for the quantitative test of the antagonistic activity. All analyses were carried out in triplicate.

### Quantitative test of antagonistic activity

Antimicrobial activity was determined *in vitro* by measuring inhibition of mycelial growth in potato-infusion-agar medium supplemented with the obtained CFS. Melted Potato-infusion agar was cooled to 45 °C and homogenously supplemented with 3 mL of CFS of each strain culture. A 5 mm diameter disc from an agar culture of the *Rhizotonia solani* belonging to the AG3 anastomosis group (donated by Dr. Gil Virgen of the University of Guadalajara) was inoculated at the center of Petri dishes containing the different supplemented media. Plates were incubated at 28 °C and fungi growth was measured at 24, 48, 72 and 96 h after start incubation. Each CFS was done in triplicate. The fungal growth observed on non-supplemented medium for 96 h was used as a control. Growth inhibition (%) was calculated as the ratio of mean diameter of fungal colony in medium with CFS / mean diameter of fungal colony in medium without CFS multiplied by 100 and the result was subtracted to 100.

### AFLP analysis

The AFLP protocol used was similar to that reported by Vos *et al.* (1995), with the exception that two, rather than three selective nucleotides were used in order to generate an adequate number of bands for analysis. Total bacterial genomic DNA was digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *MseI*, or the Tru 91 isoschizomer. The oligonucleotide primers used for the pre-amplification step were 5'-AGCTGCGTACCAATTC/A-3' and 5'GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3'. The

cepas. En el centro de placas Petri que contenían los diferentes medios suplementados se inoculó un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo de agar de *Rhizotonia solani* perteneciente al grupo de anastomosis AG3 (donado por el Dr. Gil Virgen de la Universidad de Guadalajara). Las placas se incubaron a 28 °C y se midió el crecimiento de los hongos a 24, 48, 72 y 96 h después de que comenzó la incubación. Cada CFS se hizo por triplicado. El crecimiento de hongos observado durante 96 h en el medio sin suplementos que se utilizó como control. La inhibición del crecimiento (%) se calculó como la relación entre el diámetro promedio de la colonia de hongos en un medio con CFS y el diámetro promedio de la colonia de hongos en un medio sin CFS multiplicado por 100, y al resultado se le restó 100.

#### Análisis AFLP

El protocolo AFLP que se utilizó fue similar al reportado por Vos *et al.* (1995), excepto que en este caso se utilizaron dos, en lugar de tres, nucleótidos selectivos, a fin de generar un número adecuado de bandas para el análisis. El ADN genómico bacteriano total fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*, o con el isoesquizómero Tru 91. Los iniciadores oligonucleótidos utilizados en el paso de pre-amplificación fueron 5'-AGCTGCGTACCAATTC/A-3' y 5'GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3'. Después del paso de la pre-amplificación se llevó a cabo una segunda amplificación selectiva en la que se utilizaron iniciadores similares, pero con dos nucleótidos selectivos. El iniciador *EcoRI*+AG se combinó con el iniciador *MseI* +AA, AC, AG y AT. El iniciador *EcoRI* que se utilizó en la segunda reacción de amplificación fue marcado radioactivamente con quinasa T4. Las reacciones de AFLP con los iniciadores sin ningún nucleótido o con uno selectivo se realizaron durante 20 ciclos de acuerdo con el siguiente perfil de ciclo: un paso de desnaturalización

pre-amplificación step was followed by a second selective amplification using similar primers but with two selective nucleotides. The *EcoRI*+AG primer was combined with the *MseI* primer +AA, AC, AG and AT. The *EcoRI* primer used in the second amplification reaction was radioactively labeled by using T4 kinase. AFLP reactions with primers having none or a single selective nucleotide were performed for 20 cycles with the following cycle profile: a 30 s DNA denaturation step at 94°C, a 1 min annealing step at 56°C, and a 1 min extension step at 72°C. AFLP reactions with primers having two selective nucleotides were performed for 36 cycles with the following cycle profile: a 30 s DNA denaturation step at 94°C, a 30 s annealing step (see below), and a 1 min extension step at 72°C. The annealing temperature in the first cycle was 65 °C, was subsequently reduced each cycle by 0.7°C for the next 12 cycles, and was continued at 56°C for the remaining 23 cycles. The amplification products of the second reaction were analyzed by electrophoresis on a polyacrylamide sequencing gel and visualized via autoradiography. Electrophoresis was performed at constant power, 110 W, for -2 h. Finally, the gel was analyzed in a Li-Cor Automatas sequencer mod. 4200 (Li-Cor Lincoln, Nebraska), the bands were captured and scored by use of LI-COR software.

#### Statistical Analyses

The design of the treatments was completely random. Data were subjected to ANOVA by using the version 2.5 FAUANL statistical software, for Microsoft Windows (University of Nuevo Leon, Mexico). The significance of the treatments was determined by the magnitude of the *F* value ( $P < 0.05$ ). For the differences among treatment means, the least significant difference (LSD) test was applied to obtain 95% simultaneous confidence intervals.



de ADN de 30 s a 94 °C, un paso de recocido de 1 min a 56 °C y un paso de extensión de 1 min a 72 °C. Las reacciones de AFLP con los iniciadores que tenían dos nucleótidos selectivos se realizaron durante 36 ciclos con el siguiente perfil de ciclo: un paso de desnaturalización de ADN a 94 °C, un paso de recocido de 30 s (ver abajo) y un paso de extensión de 1 min a 72 °C. La temperatura de recocido en el primer ciclo fue de 65 °C; posteriormente los ciclos se redujeron 0.7 °C durante los siguientes 12 ciclos, y continuaron a 56 °C en los 23 ciclos restantes. Los productos de la amplificación de la segunda reacción fueron analizados mediante la electroforesis utilizando un gel secuenciador de poliacrilamida y visualizados por autorradiografía. La electroforesis se realizó con corriente constante de 110 W por 2 h. Por último, el gel fue analizado en un secuenciador Automatas Li-Cor, mod. 4200 (Li-Cor Lincoln, Nebraska), las bandas se capturaron y se marcaron utilizando el programa LI-COR.

#### Análisis estadísticos

En los tratamientos se utilizó un diseño completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico FAUANL versión 2.5 para Microsoft Windows (Universidad de Nuevo León, México). La significancia de los tratamientos fue determinada por la magnitud del valor de  $F$  ( $P < 0.05$ ). Para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos, se aplicó la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD), a fin de obtener intervalos de confianza simultáneos de 95%.

## RESULTADOS

Los análisis de AFLP basados en el agrupamiento de coeficientes de similitud de Dice (Figura 1) revelaron tres grupos genéticos de bacilos. En

## RESULTS

The AFP analyses based on clustering of dice-similarity coefficients (Figure 1) revealed three genetic groups of bacilli. Group I includes *B. subtilis* Kodiak and LS213 *B. amyloliquefaciens*, group II includes BEB-13 and PY-79 *B. subtilis*; and group III includes BEB-8 *B. subtilis*. The physiological characterization of these bacteria confirmed that they are different strains. According to the Biolog database (Biolog System equipment), the microplate for the BEB-8 isolated showed the highest similarity SIM values (0.786) with *B. subtilis* providing a typical metabolic profile response for this strain (data not shown). The pH and temperature effects on the rates of growth (dN/dt) for the different strains are shown in Figure 2. The surface areas represent the growth as a function of pH and temperature. ANOVA analysis indicated that temperature, pH, and the interaction between the two factors were highly significant for the growth rate (dN/dt) of the PY-79 strain (Figure 2a). Based on this, two optimal growth conditions were determined to be 28 °C/pH 5 and 28 °C/pH 8 (Table 1A-II), which produced the maximum rates of growth of  $2.19 \times 10^5$  and  $2.36 \times 10^5$  cfu/ mL/ h respectively (Table 1A-III). For the Kodiak strain, the temperature and its interaction with pH were significant to produce the maximum rate of growth (Figure 2b). This maximum was observed at 28 °C to 5 pH units (Table 2A-II), showing no statistically significant differences in the values of the dN/dt in this range (Table 2A-III). In contrast, the BEB-8s growth rate was strongly influenced by pH, but temperature and its interaction with pH showed no differences significance (Figure 2c). Optimal conditions of growth were obtained at pH 5 and 8 independently of the incubation temperature, reaching a maximum dN/dt value of 3.5 to  $4 \times 10^8$  cfu /mL/h, respectively. The observed growing patterns were quite different for the different strains of *B. subtilis* (Table 1A-II and 1A-III).

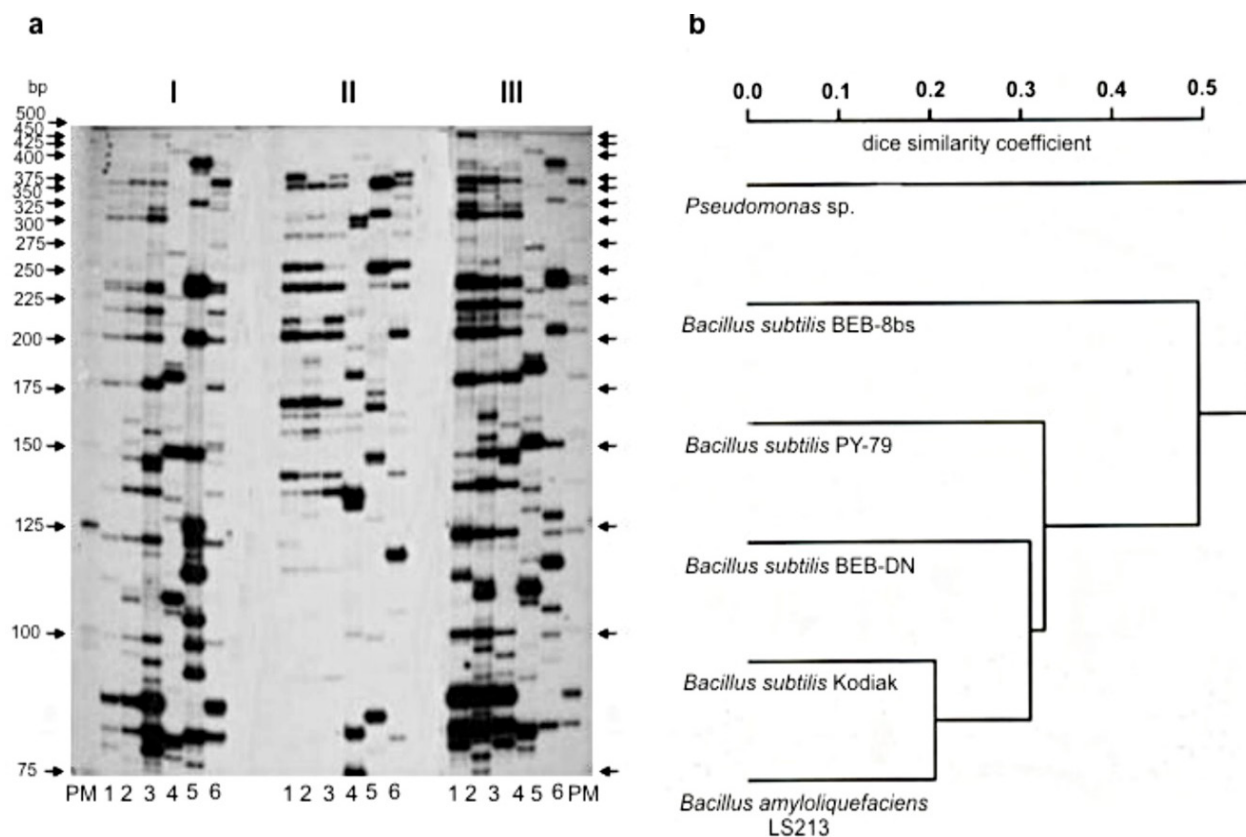


Figura 1. Huellas AFLP de las cepas de *Bacillus* utilizando el iniciador *EcoRI* marcado como  $^{32}$ -P E+AG con tres iniciadores *MseI*: *MseI*+AA (I), *MseI*+AC (II) y *MseI*+AT (III). (a) Dendrograma de diferentes cepas de *Bacillus* con base en el análisis de AFLP de las muestras con los iniciadores *EcoRI*+AG y dos *MseI*; (b) Los fragmentos de AFLP fueron analizados y los dendrogramas fueron generados como se describe en la sección de materiales y métodos. Kodiak de *B. subtilis* (1), PY-79 de *B. subtilis* (2), LS213 de *B. amyloliquefaciens* (3), *Pseudomonas* sp. (4), BEB-8bs de *B. subtilis* (5), BEB-DN de *B. subtilis* (6).

Figure 1. AFLP fingerprints of the *Bacillus* strains using the  $^{32}$ -P labeled *EcoRI* primer E+AG with three *MseI* primers *MseI*+AA (I), *MseI*+AC (II) and *MseI*+AT (III) (a). Dendrogram of different *Bacillus* strains based on AFLP analysis of the samples with *EcoRI*+AG and *MseI*-two primers (b). AFLP fragments were analyzed and dendrograms were generated as described in materials and methods. *B. subtilis* Kodiak (1), *B. subtilis* PY-79 (2), *B. amyloliquefaciens* LS213 (3), *Pseudomonas* sp. (4), *B. subtilis* BEB-8bs (5), *B. subtilis* BEB-DN (6)

el Grupo I se observaron Kodiak de *B. subtilis* y LS213 de *B. amyloliquefaciens*; en el Grupo II, BEB-13 y PY-79 de *B. subtilis*; y en el Grupo III, BEB-8 de *B. subtilis*. La caracterización fisiológica de estas bacterias confirmó que se trataba de cepas diferentes. Según la base de datos Biolog (equipo del Sistema Biolog), la microplaca de la cepa BEB-8 aislada mostró los valores de similitud SIM más

### Effect of growth conditions and physiological stage of *Bacillus* strains on the production of antagonistic metabolites

For each of the strains, the kinetic parameters were determined in the optimal growth conditions (Table 1A) and sub-optimal conditions (Table 1B). Under sub-optimal conditions of growth, a

altos (0.786), y *B. subtilis* tuvo una respuesta típica del perfil metabólico de esta cepa (datos no incluidos). Los efectos del pH y la temperatura en la tasa de crecimiento ( $dN/dt$ ) de las diferentes cepas se muestran en la Figura 2. Las áreas de la superficie representan el crecimiento como una función del pH y la temperatura. Los análisis ANOVA indicaron que la temperatura, el pH y la interacción entre estos dos factores fueron muy significativos en la tasa de crecimiento ( $dN/dt$ ) de la cepa PY-79 (Figura 2a). Con base en lo anterior, se estableció que las condiciones óptimas de desarrollo fueron 28 °C/pH 5 y 28 °C/pH 8 (Cuadro 1A-II), las cuales produjeron las máximas tasas de crecimiento de  $2.19 \times 10^5$  y  $2.36 \times 10^5$  cfu/ mL/ h, respectivamente (Cuadro 1A-III). En el caso de la cepa Kodiak, la temperatura y su interacción con el pH fueron significativas y produjeron la tasa máxima de crecimiento (Figura 2b). Esta tasa máxima se observó a 28 °C y a 5 unidades de pH (Cuadro 1A-II), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de  $dN/dt$  en este rango (Cuadro 1A-III). En cambio, el pH influyó mucho en la tasa de crecimiento de la cepa BEB-8b, pero la temperatura y su interacción con el pH no mostraron diferencias significativas (Figura 2c). Las condiciones óptimas de crecimiento se obtuvieron con pH 5 y 8, independientemente de la temperatura de incubación, y alcanzaron un valor máximo de  $dN/dt$ , de  $3.5$  a  $4 \times 10^8$  cfu/ mL/h, respectivamente. Los patrones de crecimiento observados fueron muy diferentes entre las diferentes cepas de *B. subtilis* (Cuadros 1A-II y 1A-III).

#### **Efecto de las condiciones de crecimiento y la etapa fisiológica de las cepas de *Bacillus* en la producción de metabolitos antagonistas**

Los parámetros cinéticos de cada una de las cepas se determinaron en condiciones óptimas (Cuadro 1A)

significant decrease in the specific rate of growth ( $\mu$ ) of each strain was observed, which contrast with the conditions in which the rate  $dN/dt$  was maximum. Under suboptimal conditions they show faster growth rates than optimal conditions, however, under these conditions there is no inhibition of *Rhizoctonia* except for the BeB 8 strain. (Figure 3). However, the time required to reach the stationary phase was similar for the Kodiak and BeB-8 strains, in both conditions, while the PY-79 took almost 10 more hours in sub-optimal conditions (Table 1A-III and 1B-III). Nevertheless, the most significant effect was observed in the carrying capacity of media (K). Under sub-optimal growth conditions, a reduction of one logarithmic unit ( $1.97$  to  $0.19 \times 10^5$  cfu/ mL/ h) was detected for PY-79 strain, a slight reduction from  $0.804 \times 10^6$  to  $0.65 \times 10^6$  cfu/ mL/ h corresponded to Kodiak strain, and a reduction from  $3.14 \times 10^8$  to  $2.48 \times 10^8$  cfu/ mL/ h for the BEB-8 strain was observed. The effect of the physiological stage of each strain on the antagonistic activity against *Rhizoctonia solani* AG-3, under optimal and sub-optimal conditions of growth is shown in Figure 3. Under optimal conditions of growth, the BEB-8bs strain showed a similar antagonistic activity to the Kodiak strain (positive control). In the exponential growth phase (log), they both caused 15 to 25% fungal growth inhibition, while in the stationary phase, they caused 64 to 72% of fungal growth inhibition. As expected, the PY-79 strain (negative control) showed no significant inhibition of fungal growth (Figure 3a). Under conditions of minimal growth, the positive control Kodiak strain in the different stages of development, showed no antagonistic activity, however, the BEB-8 strain in the stationary phase reduced fungal growth by 25%. These results indicate that the highest biocontrol activity is in the stationary phase.

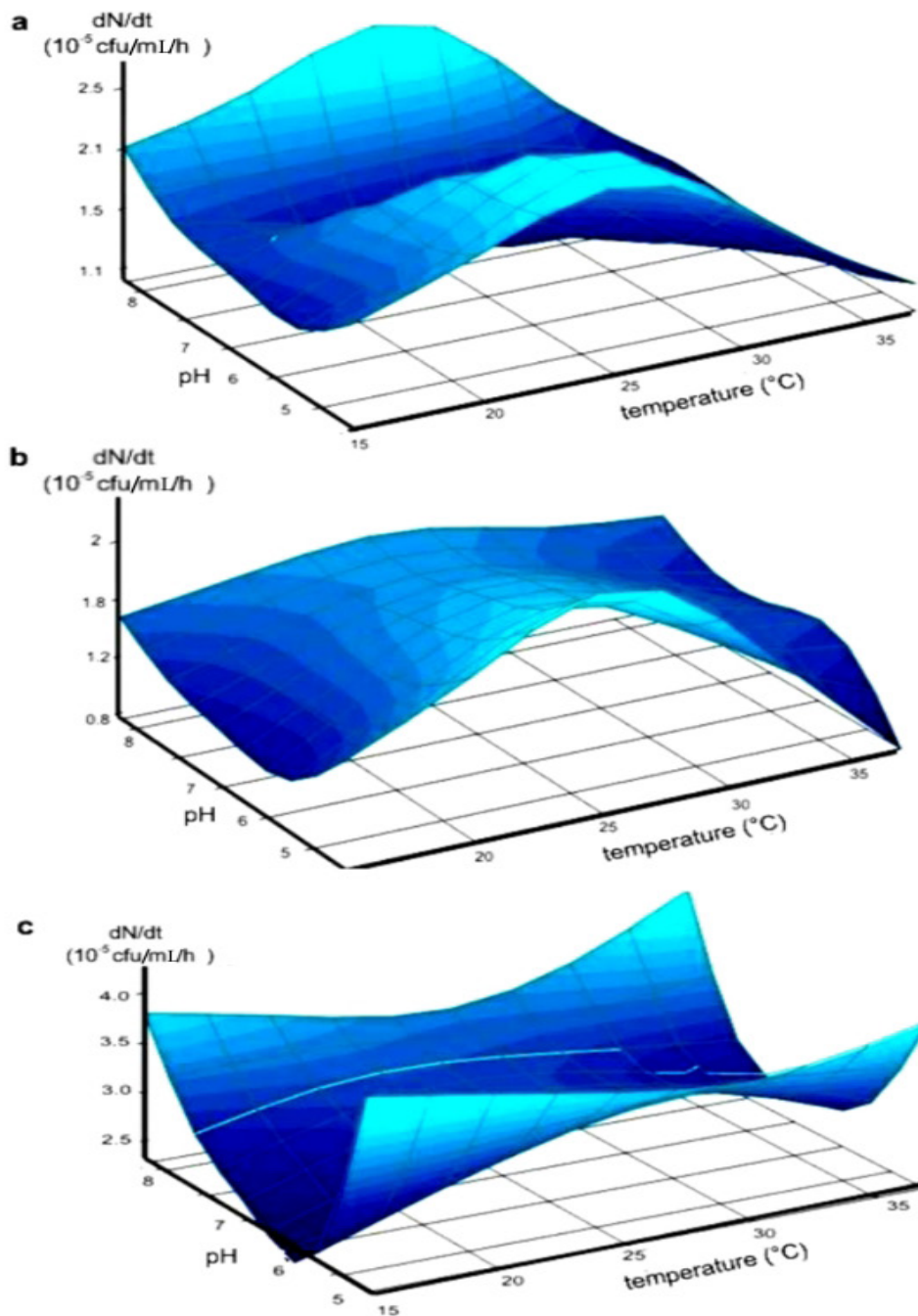


Figura 2. Efecto del pH y la temperatura en la tasa de crecimiento ( $dN/dt$ ) de las cepas de *Bacillus subtilis* representado por la superficie, que es considerada una función del pH y la temperatura. Cepa PY-79 como control negativo de la actividad antagonista (a). cepa Kodiak; control positivo de la actividad antagonista (b), cepa BEB-8b (c).

Figure 2. Effect of pH and temperature on the rate of growth ( $dN/dt$ ) of the *Bacillus subtilis* strains represented by the surface, which is considered a function of pH and temperature. PY-79 strain negative control of antagonistic activity (a). Kodiak strain; positive control of antagonistic activity (b), BEB-8bs strain (c).



**Cuadro 1. Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *Bacillus subtilis*.**  
**Table 1. Kinetic parameters of growth of *Bacillus subtilis* strains.**

| A. Condiciones óptimas de desarrollo.    |                     |                                       |                       |                            |                      |                   |
|------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------|-------------------|
| Cepa de <i>Bacillus subtilis</i>         | I. No               | II. Condiciones óptimas de desarrollo | K                     | III. Parámetros cinéticos: |                      |                   |
|                                          |                     |                                       |                       | $\mu$                      | $dN/dt_{max}$        | $t_{dN/dt_{max}}$ |
| PY-79                                    | 2.8x10 <sup>5</sup> | 28°C/pH 5                             | 1.97x10 <sup>5</sup>  | 0.444                      | 2.19x10 <sup>5</sup> | 4.90              |
|                                          |                     | 28°C/pH 8                             | 1.88x10 <sup>5</sup>  | 0.498                      | 2.36x10 <sup>5</sup> | 12.21             |
| Kodiak                                   | 1.2x10 <sup>6</sup> | 28°C/pH 5                             | 0.804x10 <sup>6</sup> | 0.808                      | 1.62x10 <sup>6</sup> | 6.32              |
|                                          |                     | 28°C/pH 6                             | 0.806x10 <sup>6</sup> | 0.779                      | 1.57x10 <sup>6</sup> | 6.08              |
|                                          |                     | 28°C/pH 7                             | 0.752x10 <sup>6</sup> | 0.713                      | 1.34x10 <sup>6</sup> | 5.65              |
|                                          |                     | 28°C/pH 8                             | 0.816x10 <sup>6</sup> | 0.701                      | 1.43x10 <sup>6</sup> | 6.65              |
| BEB-8b                                   | 2.2x10 <sup>8</sup> | 15°C/pH 5                             | 3.14x10 <sup>8</sup>  | 0.535                      | 4.20x10 <sup>8</sup> | 8.93              |
|                                          |                     | 15°C/pH 8                             | 3.43x10 <sup>8</sup>  | 0.439                      | 3.77x10 <sup>8</sup> | 9.20              |
|                                          |                     | 28°C/pH 5                             | 2.35x10 <sup>8</sup>  | 0.633                      | 3.37x10 <sup>8</sup> | 6.36              |
|                                          |                     | 28°C/pH 8                             | 1.16x10 <sup>8</sup>  | 0.608                      | 3.30x10 <sup>8</sup> | 6.02              |
|                                          |                     | 37°C/pH 5                             | 2.43x10 <sup>8</sup>  | 0.442                      | 3.98x10 <sup>8</sup> | 5.66              |
|                                          |                     | 37°C/pH 8                             | 2.62x10 <sup>8</sup>  | 0.602                      | 3.41x10 <sup>8</sup> | 5.95              |
| B. Condiciones subóptimas de desarrollo. |                     |                                       |                       |                            |                      |                   |
| Cepa de <i>Bacillus subtilis</i>         | I. No               | II. Condiciones óptimas de desarrollo | K                     | III. Parámetros cinéticos: |                      |                   |
|                                          |                     |                                       |                       | $\mu$                      | $dN/dt_{min}$        | $t_{dN/dt_{min}}$ |
| PY-79                                    | 2.8x10 <sup>5</sup> | 37°C/pH 6                             | 0.19x10 <sup>5</sup>  | 0.156                      | 0.77x10 <sup>5</sup> | 11.01             |
| Kodiak                                   | 1.2x10 <sup>6</sup> | 37°C/pH 5                             | 0.65x10 <sup>6</sup>  | 0.459                      | 0.74x10 <sup>6</sup> | 5-78              |
| BEB-8b                                   | 2.2x10 <sup>8</sup> | 15°C/pH 6                             | 2.48x10 <sup>8</sup>  | 0.319                      | 1.19x10 <sup>8</sup> | 8.71              |

No; inóculo inicial (cfu /mL), K; la capacidad de carga de los medios (10<sup>n</sup> cfu /mL), generalmente interpretada como la cantidad de recursos expresados en el número de organismos que estos recursos pueden mantener.  $\mu$  velocidad específica de crecimiento / h,  $\mu$  significativamente diferente de  $\mu = 0$ , a > 95% del nivel de confianza,  $dN/dt$ ; tasa máxima de crecimiento (10<sup>n</sup> cfu /ml/ h),  $t_{dN/dt}$ ; tiempo en que se alcanza la tasa máxima o mínima de crecimiento (h.min). El ajuste de  $r^2$  al modelo logístico fue de > 95% del nivel de confianza / x

xNo; initial inoculum (cfu /mL), K; carrying capacity of media (10<sup>n</sup> cfu /mL), usually interpreted as the amount of resources expressed in the number of organisms that can be supported by these resources.  $\mu$  specific speed of growth / h,  $\mu$  significantly different from  $\mu = 0$ , to > 95% of confidence level,  $dN/dt$ ; maximum rate of growth (10<sup>n</sup> cfu /ml/ h),  $t_{dN/dt}$ ; time in which the maximum or minimal rate of growth is reached the (h.min). The adjustment of  $r^2$  to the logistic model was > 95% of confidence level.

y condiciones subóptimas de desarrollo (Cuadro 1B). En condiciones subóptimas de desarrollo, se observó una reducción significativa en la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de cada cepa, lo cual contrasta con las condiciones que generaron la tasa máxima de  $dN/dt$ . En condiciones subóptimas, las tasas de crecimiento son más rápidas que en condiciones óptimas. Sin embargo, bajo esas condiciones no se detectó inhibición de *Rhizoctonia*, excepto en la cepa BeB 8 (Figura 3). Sin embargo, el tiempo requerido para alcanzar la fase estacionaria fue similar en las cepas Kodiak y BeB-8, en ambas condiciones, en tanto que PY-79 tardó casi 10 horas

## DISCUSSION

The application of microbial inoculants as biocontrol agents has largely been unsuccessful (Compant *et al.*, 2005). This is due to plant protection being largely determined by an efficient colonization of the rhizosphere by inoculants and the competition with better adapted indigenous microflora (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Conn y Franco 2004; Kozdrój y Van, 2000). These factors can greatly influence the establishment, proliferation, and activity of bacilli in a nutrient-limited environment. The utilization of a wide range

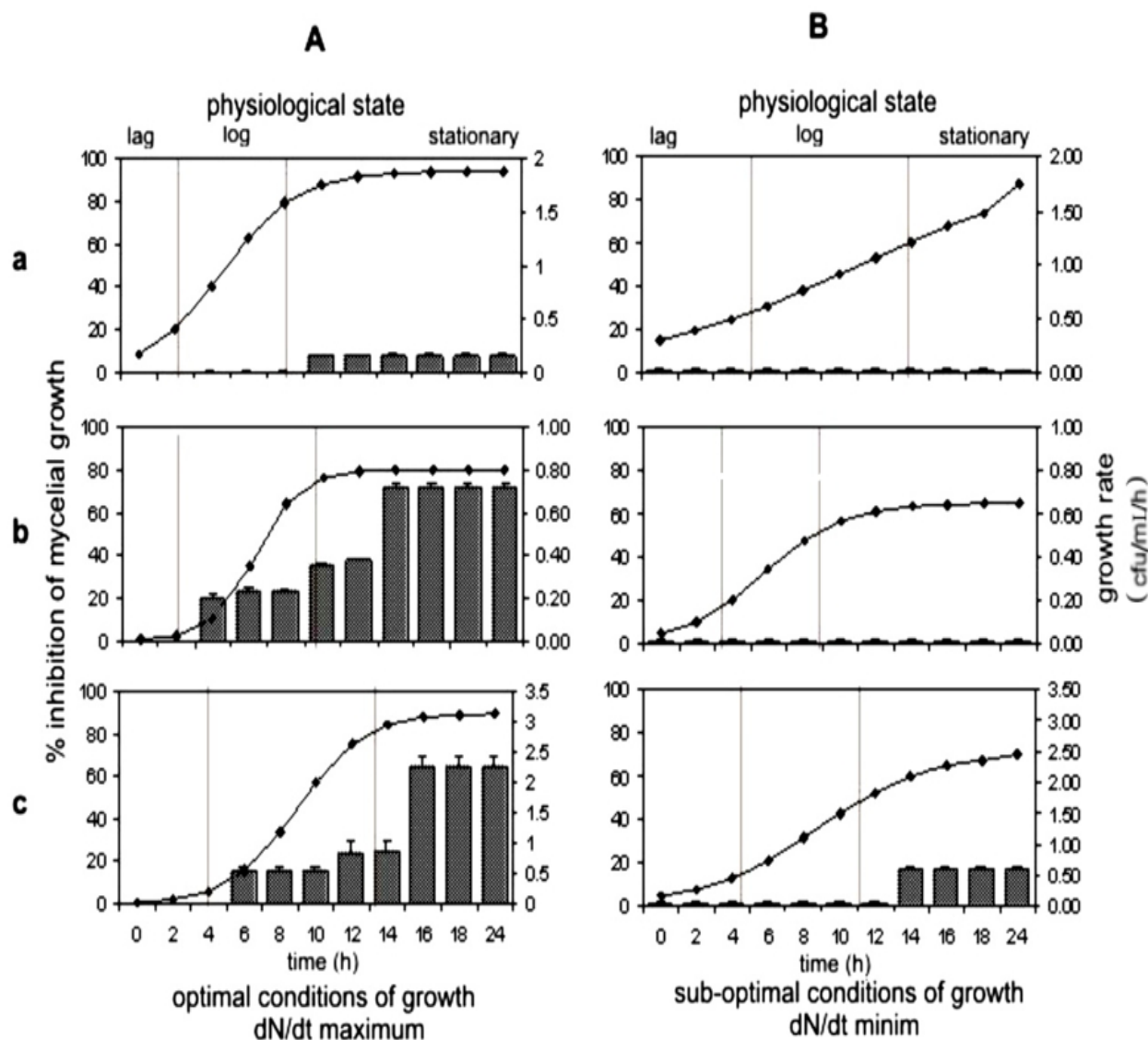


Figura 3. Efecto del estado fisiológico y condiciones de crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis* en la actividad antagonista contra *Rhizoctonia solani* AG-3. Crecimiento bacteriano en condiciones óptimas (A) y condiciones subóptimas (B) del aislado PY-79 de *B. subtilis* (a), Kodiak de *B. subtilis* (b), y BEB-8b de *B. subtilis* (c).

Figure 3. Effect of the physiological state and growth conditions of *Bacillus subtilis* strains on the antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani*. AG-3. Bacterial growth under optimal conditions (A), and under sub-optimal conditions (B) of *B. subtilis* PY-79 (a), *B. subtilis* Kodiak (b) and *B. subtilis* BEB-8bs (c).

más en condiciones subóptimas (Cuadros 1A-III y 1B-III). No obstante, el efecto más significativo se observó en la capacidad de carga del medio (K). En condiciones subóptimas de desarrollo se detec-

of root exudates is correlated with the bacterial competitive ability and constitutes the nutritional basis of rhizosphere colonization (Bais *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2008). In this study, the BIOLOG

tó la reducción de una unidad logarítmica ( $1.97$  a  $0.19 \times 10^5$  cfu /mL/h) en la cepa PY-79; una ligera reducción de  $0.804 \times 10^6$  a  $0.65 \times 10^6$  cfu /mL/h correspondió a la cepa Kodiak, y se observó una reducción de  $3.14 \times 10^8$  a  $2.48 \times 10^8$  cfu /mL/h en la cepa BEB-8. En la Figura 3 se muestra el efecto de la etapa fisiológica de cada cepa en la actividad antagonista contra *Rhizoctonia solani* AG-3, bajo condiciones óptimas y subóptimas de crecimiento. En condiciones óptimas de crecimiento, la cepa BEB-8b mostró una actividad antagonista similar a la de la cepa Kodiak (control positivo). En la fase de crecimiento exponencial (log), ambas causaron una inhibición de 15 a 25% en el crecimiento fúngico, en tanto que, en la fase estacionaria, causaron una inhibición de 64 a 72%. Como se había previsto, la cepa PY-79 (control negativo) no mostró inhibición significativa del crecimiento fúngico (Figura 3a). Bajo condiciones de crecimiento mínimo, la cepa Kodiak (control positivo) no mostró actividad antagonista en las diferentes etapas de crecimiento; sin embargo, la cepa BEB-8 redujo en 25% el crecimiento fúngico en la fase estacionaria. Estos resultados indican que la mayor actividad de biocontrol ocurre en la fase estacionaria.

## DISCUSIÓN

La aplicación de inoculantes microbianos como agentes de biocontrol no ha tenido mucho éxito (Compant *et al.*, 2005). Esto se debe a que la protección de las plantas es determinada en gran medida por la eficiente colonización de la rizosfera por los inoculantes y la competencia con la microflora nativa, que está mejor adaptada (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Conn y Franco 2004; Kozdrój y Van, 2000). Estos factores influyen mucho en el establecimiento, proliferación y actividad de los bacilos en un ambiente donde los nutrientes son limitados.

test indicated that the isolated BEB-8 was a strain of *B. subtilis* and confirmed the identities of PY-79 and Kodiak strains used as controls. Our results also confirmed the ability of the different strain of *Bacillus* to use a great variety of carbon sources. As indicated by Goddard *et al.* (2001) and Smalla *et al.* (1998) in yours studies, BIOLOG microtiter plates were originally developed for classification of bacterial isolates based on the ability of the isolates to oxidize 95 different carbon sources. However, this method has proved to be a useful tool for evaluating carbon source utilization patterns of microbial communities, potential metabolic differences between rhizosphere bacterial populations as well as for studying the effects of introduced inocula on soil microbial communities. In addition, although the metabolic profile of the three strains indicated that they were *Bacillus subtilis*, the AFLP analysis produced high-quality DNA fingerprints with detectable polymorphisms and revealed strain-level variations. This strain to strain variability confirms that they are different strains. Jones *et al.* (2005) described the individualization as the process by which morphological, biochemical or genetic characteristics are associated with a microorganism, such that a combination of characteristics is unique to that microorganism and exclude another microorganism. However, knowledge of the environmental niche where the biocontrol agent is able to grow is essential to establish the conditions for mass-production and also to become highly effective as a biocontrol agent. The most important environmental parameters are the water availability, temperature and pH of the rhizosphere (Costa *et al.*, 2002). The physiological study of the *Bacillus* strains carried out in this work confirmed that environmental factors, such as pH and temperature, directly influence the capacity of growth and biocontrol activity. The findings reported in the present study clearly demonstrate

La utilización de una amplia variedad de exudados de raíz está correlacionada con la capacidad competitiva de las bacterias y constituye la base nutricional de la colonización de la rizosfera (Bais *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2008). En este estudio, la prueba BIOLOG indicó que el aislamiento BEB-8 es una cepa de *B. subtilis* y confirmó las identidades de las cepas PY-79 y Kodiak utilizadas como controles. Nuestros resultados también confirmaron la capacidad de las diferentes cepas de *Bacillus* de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono. Como señalaron Goddard *et al.* (2001) y Smalla *et al.* (1998) en sus estudios, las placas microtituladoras BIOLOG originalmente fueron creadas para clasificar los aislamientos bacterianos con base en su capacidad de oxidar 95 distintas fuentes de carbono. Sin embargo, este método ha resultado ser útil para evaluar los patrones de utilización de las fuentes de carbono de las comunidades microbianas y las posibles diferencias metabólicas entre las poblaciones bacterianas de la rizosfera, así como estudiar los efectos de los inóculos introducidos en las comunidades microbianas del suelo. Además, aunque el perfil metabólico de las tres cepas mostró que se trataba de *Bacillus subtilis*, el análisis AFLP produjo huellas de ADN de alta calidad con polimorfismos detectables y reveló variaciones a nivel de cepa. La variabilidad entre estas cepas confirmó que son diferentes. Jones *et al.* (2005) describieron la individualización como el proceso mediante el cual las características morfológicas, bioquímicas o genéticas se asocian con un microorganismo, de manera tal que la combinación de características es únicamente de ese microorganismo y de ningún otro. Sin embargo, es fundamental conocer las condiciones ambientales en que el agente de biocontrol puede crecer, a fin de establecer las condiciones de producción en masa y también para que se convierta en un agente de biocontrol muy eficaz. Los parámetros ambientales más importantes son la

that the environmental niche for the optimal growth of BEB-8 strain is at a temperature range of 15-37 °C and a pH between 5 and 8. Interestingly pH but not temperature influences growth rate in the ranges of the present study. However, the favorable environmental conditions where the Kodiak commercial preparation is able to grow are 28 °C in a pH range of 5-8, as was indicated by the significance of the effect of interaction between temperature and pH on dN/dt. A microbial species usually has a fairly wide range of environmental conditions in which it will grow. However, the growth rate is the variable physiological microbial initially affected by changes in the environment. The lack of direct measurements of this factor has been a major drawback in understanding the rhizosphere effects in soil. Based on this, the biological and physiological characterization of *Bacillus subtilis* with antagonistic activity carried out in the present work is of great importance. In a recent report, Costa *et al.* (2002) defined the range of environmental conditions over which CPA-2 strain of *Pantoea agglomerans* may be developed for biological control. They determined the effect of water availability, temperature, pH, and their interactions on the growth of the bacteria under *in vitro* conditions. Nevertheless, in contrast to our results, Costa *et al.* (2000) did not correlate the growth conditions or physiological status of the bacteria with the antagonistic activity of *P. agglomerans*. The results shown in Table 1 and Figure 3 emphasize the effects of proliferation, kinetics parameters and physiological status for each strain on antagonistic activity. Under optimal growth conditions, the CFS obtained from the exponential growth phase of the Kodiak and BEB-8 strains showed mycelial growth inhibition of *R. solani*. However, a greater inhibitory activity was achieved using CFS obtained during the stationary phase of either strain. On the contrary, altering pH



disponibilidad de agua, la temperatura y el pH de la rizosfera (Costa *et al.*, 2002). El estudio fisiológico de las cepas de *Bacillus* que se realizó como parte de este trabajo confirmó que los factores ambientales, como el pH y la temperatura, influyen directamente en la capacidad de crecimiento y en la actividad de biocontrol. Los resultados que se presentan en este estudio demuestran claramente que las condiciones ambientales para el crecimiento óptimo de la cepa BEB-8 incluyen rangos de temperatura de 15 a 37 °C y de pH desde 5 hasta 8. Es interesante notar que fue el pH y no la temperatura lo que influyó en la tasa de crecimiento en los rangos del presente estudio. Sin embargo, las condiciones ambientales favorables en que la preparación comercial de Kodiak crece son de 28 °C en un rango de pH desde 5 hasta 8, como lo indica la importancia del efecto de la interacción entre la temperatura y el pH en  $dN/dt$ . Una especie microbiana suele tener una diversidad bastante amplia de condiciones ambientales en las que puede crecer. Sin embargo, la tasa de crecimiento es la variable fisiológica microbiana que es inicialmente afectada por los cambios en el medioambiente. La falta de mediciones directas de este factor ha sido un gran obstáculo para entender los efectos de la rizosfera en el suelo. Con base en lo anterior, la caracterización biológica y fisiológica de *Bacillus subtilis* con actividad antagonista realizada en el presente estudio es muy importante. En un reciente informe, Costa *et al.* (2002) definieron la serie de condiciones ambientales en las que sería posible desarrollar la cepa CPA-2 de *Pantoea agglomerans* para control biológico. Los autores señalaron el efecto de la disponibilidad de agua, la temperatura, el pH y sus interacciones en el crecimiento de las bacterias en condiciones *in vitro*. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, Costa *et al.* (2000) no correlacionaron las condiciones de crecimiento ni el estado fisiológico de las bacterias con la actividad antagonista de *P. agglomerans*.

and temperature to obtain a minimal growth rate caused the antagonistic capacity to be reduced or lost independently of the physiological state of the bacterium.

The relationship between bacterial growth rate and environmental conditions involves different response mechanisms. In this context, it has been reported that production of many secondary metabolites is regulated through a two-component system that is activated by an external or internal signal (Grahovac *et al.*, 2015). The signals that activate the system are pH, temperature, osmolarity, and bacterial density. This regulatory system has been identified in different bacteria and is involved in the regulation of many different bacterial traits such as motility, pili formation, pathogenicity, siderophores and secondary metabolites production. (Cosby *et al.*, 1998; Horswill, 2007). Ahlem *et al.* (2012) show that biosynthesis of the antagonistic factor, as well as the effectiveness of biological control strictly depend on the growth conditions (pH, temperature) this supports our results. Likewise, the physiological status should also be considered when thinking about the life of the bacteria when it is applied to the soil. This depends on the prevailing conditions in the soil, which represents a crucial factor in establishing and maintaining bacterial inocula in natural environments. This hypothesis is also supported by the results of Vandenhove *et al.* (1993), who demonstrated that exponentially growing *Azospirillum* cells inoculated into soil lead to a higher and more stabilized population than those inoculated during stationary phase. The authors concluded that the physiological state of an inoculum greatly influences its survival. In addition, Selim *et al.* (2005), reported that production of the antagonistic factor by B2 strain of *Paenibacillus sp* was detected in the middle of the exponential growth phase, but the maximum production was reached at the end of the stationary

Los resultados que se muestran en el Cuadro 1 y la Figura 3 resaltan los efectos de la proliferación, los parámetros cinéticos y el estado fisiológico de cada cepa en la actividad antagonista. En condiciones óptimas de desarrollo, el CFS obtenido en la fase de crecimiento exponencial de las cepas Kodiak y BEB-8 mostró inhibición del crecimiento micelial de *R. solani*. Sin embargo, hubo mayor actividad inhibitoria cuando se utilizó el CFS obtenido durante la fase estacionaria de cada cepa. En cambio, al alterar el pH y la temperatura para obtener una tasa de crecimiento mínima, la capacidad antagonista se redujo o se perdió, independientemente del estado fisiológico de la bacteria.

La relación entre la tasa de crecimiento bacteriano y las condiciones ambientales involucra diferentes mecanismos de respuesta. En este contexto, se ha reportado que la producción de numerosos metabolitos secundarios es regulada mediante un sistema de dos componentes que es activado por una señal externa o interna (Grahovac *et al.*, 2015). Las señales que activan el sistema son el pH, la temperatura, la osmolaridad y la densidad bacteriana. Se ha identificado este sistema regulatorio en diferentes bacterias y se sabe que está relacionado en la regulación de numerosas y diferentes características bacterianas como la motilidad, la formación de pili, la patogenicidad, los sideróforos y la producción de metabolitos secundarios (Cosby *et al.*, 1998; Horswill, 2007). Ahlem *et al.* (2012) mostraron que la biosíntesis del factor antagónico, así como la eficacia del control biológico, dependen estrictamente de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura), y esto respalda nuestros resultados. De igual manera, también se debe tener en cuenta el estado fisiológico al pensar en la vida de las bacterias cuando se aplican al suelo. Esto depende de las condiciones que prevalecen en el suelo, lo cual representa un factor clave en el establecimiento y mantenimiento de los inóculos

phase. These results are similar to those reported in the present work (Figure 3). These observations are particularly relevant since most of the literature describes the production of antagonistic metabolites by *B. subtilis* at the early stages of the stationary phase, which coincides with the beginning of the sporulation process. (Leclère *et al.*, 2005; Savluchinske *et al.*, 2004). The enzymes required for production of these metabolites begin in early stages of population growth, but it is not until the end of the exponential phase when the biofilm begins to form when its activity is greater as shown by the transcriptomic studies conducted by Kröber *et al.* (2016). The subsequent enzymatic activity can cease within a few hours. However, this is not a general rule, since according to the results shown in Figure 3, there is still antagonistic activity on *Rhizoctonia solani* by strains BEB-8 and Kodiak.

Finally, each metabolite may require a specific pH-range and temperature for its activity. This study reveals that all the examined factors influenced the antifungal activity against *Rhizoctonia solani* and that interactions between the factors were also important. In conclusion, studies focused on the physiological characteristics and kinetic parameters of growth of *Bacillus subtilis* strains that allow to better understand bacterial behavior in the biological control of *Rhizoctonia solani*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Biol. Fernando Hernández Godínez for a technical assistance and Dra. June Simpson for a critical review of this manuscript. The research was carried out in the Department of Biotechnology and Biochemistry Cinvestav-Irapuato. This work received financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; CONACyT, Mexico (Postdoctoral Research). Support for this research also came from CONACyT-SEP-106401 y 61238.

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

bacterianos en ambientes naturales. Esta hipótesis también es respaldada por los resultados obtenidos por Vandenhove *et al.* (1993), que demostraron que al inocular en el suelo células de *Azospirillum* con crecimiento exponencial, esto fomenta el establecimiento de una población más grande y estable que cuando se inoculan células durante la fase estacionaria. Los autores llegaron a la conclusión de que el estado fisiológico de un inóculo tiene gran influencia en su supervivencia. Además, Selim *et al.* (2005) reportaron que la producción del factor antagónico de la cepa B2 de *Paenibacillus* sp. fue detectada a mediados de la fase de crecimiento exponencial, pero la máxima producción ocurrió al final de la fase estacionaria. Estos resultados son similares a los que se presentan en este trabajo (Figura 3). Estas observaciones son particularmente relevantes, ya que la mayor parte de la literatura indica que *B. subtilis* produce metabolitos antagonistas en las primeras etapas de la fase estacionaria, que coincide con el comienzo del proceso de esporulación (Leclère *et al.*, 2005; Savluchinske *et al.*, 2004). Las enzimas requeridas para producir estos metabolitos empiezan a formarse en las primeras etapas del crecimiento de la población, pero no es sino hasta el final de la fase exponencial cuando se empieza formar el biopelícula, es decir, cuando tiene mayor actividad, como lo muestran los estudios transcriptómicos realizados por Kröber *et al.* (2016). La actividad enzimática posterior puede terminar en pocas horas. Sin embargo, esta no es una regla general, ya que, de acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 3, aún hay actividad antagonista en *Rhizoctonia solani* impulsada por las cepas BEB-8 y Kodiak.

Por último, cada metabolito requiere un rango específico de pH y temperatura para su actividad. Este estudio revela que todos los factores evaluados influyeron en la actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani* y que las interacciones entre los

factores también fueron importantes. En conclusión, los estudios enfocados en las características fisiológicas y los parámetros cinéticos del crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis* nos permiten entender mejor el comportamiento bacteriano en el control biológico de *Rhizoctonia solani*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Biol. Fernando Hernández Godínez por la asistencia técnica que les proporcionó, y a la Dra. June Simpson por la revisión crítica de este manuscrito. La investigación se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-Irapuato. Para la realización de este trabajo se recibió apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; CONACyT, México (investigación de posdoctorado). Agradecemos también el apoyo que nos proporcionaron CONACyT-SEP-106401 y 61238.

LITERATURA CITADA

- Ahlem H, Mohammed E, Badoc A and Ahmed L. 2012. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of Botrytis cinerea by Bacillus amyloliquefaciens isolates. African Journal of Biotechnology 11:2210-2217. Disponible en línea: <http://www.academicjournals.org/AJB> DOI: 10.5897/AJB11.645
- Ashlee M, Losick ER and Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology 16:269-275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Ashlee M, Losick ER and Kolter R. 2007. *Bacillus subtilis* Genome Diversity. Journal. Bacteriology 189:1163-1170. Disponible en línea: <http://jb.asm.org/content/189/3/1163.short>
- Bais HP, Fall R and Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134:307-319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bais HP, Weir TF, Perry LG, Gilroy S and Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology 57:233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bapat S and Shah AK. 2000. Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*. Canadian Journal of Microbiology 46:25-132. <https://doi.org/10.1139/w99-109>

- Bernal G, Illanes A and Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electronic Journal of Biotechnology* 5:12-20. Disponible en línea: <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v5n1/04.pdf>
- Bloemberg G and Lugtenberg B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion Plant Biology* 4:343-350. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7)
- Castro SS, Herschkovitz Y, Okon Y and Jurkevitch E. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *Microbiology Letters* 276:1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00878.x>
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C and Ait Barka E. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Conn VM and Franco CMM. 2004. Effect of microbial inoculants on the indigenous actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6407-6413. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6407-6413.2004>
- Cosby WM, Vollenbroich D, Lee OH and Zuber P. 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0k oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular compounds. *Journal of Bacteriology* 180:1438-1445. Disponible en línea: <http://jb.asm.org/content/180/6/1438.short>
- Costa E, Usall J, Teixido N, Delgado J and Viñas I. 2002. Water activity, temperature and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Canadian Journal of Microbiology* 48:1082-1088. <https://doi.org/10.1139/w03-001>
- Fujinami S and Fujisawa M. 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes-past, present and future. *Environmental Technology* 31:845-856. <http://dx.doi.org/10.1080/09593331003762807>
- Goddard VJ, Bailey MJ, Darrah P, Lilley AK and Thompson IP. 2001. Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: a community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. *Plant and Soil* 232:181-193. <https://doi.org/10.1023/A:1010302607616>
- Gong M, Wang JD, Zhang J, Yang H, Lu XF, Pei Y and Cheng JQ. 2006. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (Iturin A). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38:233-240. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
- Grahovac JA, Rončević ZZ, Tadijan IŽ, Jokić AI and Dodić JM. 2015. Optimization of media for antimicrobial compounds production by *Bacillus subtilis*. *Acta Alimentaria* 44:427-435. DOI: 10.1556/066.2015.44.0014
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JJ, Balesdent J, Heulin T and Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2:1221-1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Horswill AR, Stoodley P, Stewart PS and Parsek MR. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:371-380. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0720-y>
- Johnson LF and Curl EA. 1972. Culture media. In *Methods for research on the ecology of soil borne plant pathogens*. Burgess Publishing Company Auburn, Alabama 16:187-208. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19731903549>
- Jones SW, Dobson ME, Francesconi SC, Schoske R and Crawford R. 2005. DNA assays for detection, identification, and Individualization of select agent microorganisms. *Croatian Medical Journal* 46:522-529. Disponible en línea: <http://neuron.mefst.hr/docs/CMJ/issues/2005/46/4/16100754.pdf>
- Kamnev AA. 2008. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling. *Journal of Spectroscopy* 22:83-95. <http://dx.doi.org/10.3233/SPE-2008-0329>
- Kim PLL, Ryu J, Kim YH and Chl YT. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin, and surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Microbiology and Biotechnology* 20:138-145. <http://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>
- Kozdrój J and Van Elsas JD. 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1405-1417. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00058-4)
- Kröber M, Verwaaijen B, Wibberg D, Winkler A, Pühler A and Schlüter A. 2016. Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. *Journal Biotechnology* 231:212-223. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.06.013
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M and Jacques P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4577-4584. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005>
- Matarante A, Baruzzi F, Coconcelli PS and Morea M. 2004. Genotyping and toxigenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains occurring in industrial and artisanal cured sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5168-5176. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5168-5176.2004>
- Nagórka K, Bikowski M and Obuchowski M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 54:495-508. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882321>
- O'Callaghan M, Gerrard EM and Johnson VW. 2001. New Zealand Plant Protection 54:128-135. Disponible en línea: https://nzpps.org/journal/54/nzpp_541280.pdf

- Ongena M and Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiology 16:116-125. DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.009
- Pal KK and B. Mc Spadden Gardener. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02
- Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, López de León A, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, Olsen PB, Rasmussen MD, Andersen JT, Jørgensen L, Larsen TS, Sorokin A, Bolotin A, Lapidus A, Galleron N, Ehrlich SD and Berka RM. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. Genome Biology 5:r77. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-R77>
- Savluchinske FS, Barbosa A, Cabrita M, Nunes L, Esteves A, Roseiro JC and Curto MJ. 2004. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 31:199-203. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0133-x>
- Schallmeyer M, Singh A and Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology 50:1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Selim S, Negrel J, Govaerts C, Gianinazzi S and Van Tuinen D. 2005. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 71:6501-6507. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6501-6507.2005>
- Shelburne CE, An FY, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin DE and Lantz MS. 2007. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59:297-300. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl495>
- Slater J. 1985. Microbial growth dynamics. In: Comprehensive biotechnology, Mac-Young, M. (eds). Oxford Pergamon, p. 184-213.
- Smalla K, Wachtendorf U, Hever H, Liu WT and Forney L. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 64:1220-1225. Disponible en línea: <http://aem.asm.org/content/64/4/1220.short>
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology 56:845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Tamehiro N, Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S, Ubukata M, Hamada M, Naganawa H and Ochi K. 2002. Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:315-320. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.315-320.2002>
- Vandenhove H, Merck R, Van Steenberghe M and Vlassak K. 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. Soil Biology and Biochemistry 25:513-519. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90077-O](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90077-O)
- Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Bäumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, Ehrenreich A and Gottschalk G. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 7:204-211. <https://doi.org/10.1159/000079829>
- Vos P, Hoger R, Bleker M, Reijmans M, Van de Lec T, Hones M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kaiper M and Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research 23:4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Zhang X, Zhannng B, Zhang Z, Shen W, Yang C, Yu J and Zhao Y. 2005. Survival of the biocontrol agents *Brevibacillus brevis* ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116 on the spikes of barley in the field. Journal Zhejiang University SCIENCE. B. 6:770-777. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0770>

Pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* in varieties and wheat lines grown in Paraguay

Patogenicidad de *Magnaporthe oryzae* en variedades y líneas de trigo cultivadas en Paraguay

Alice Rocío Chávez*, Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas CAPECO, Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, Paraguay; Man Mohan-Kohli, Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas CAPECO, Av. Brasilia 840, Asunción, Paraguay. *Autor para correspondencia: alice.r.chavez@gmail.com.

Recibido: 14 de Diciembre, 2017.

Aceptado: 02 de Febrero, 2018.

Chávez AR, Mohan-Kohli M. 2018. Pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* in varieties and wheat lines grown in Paraguay. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2): 276-286.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-3

Primera publicación DOI: 06 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 06, 2018.

Resumen. El brusone causado por *Magnaporthe oryzae* patotipo *Triticum*, es uno de los problemas más serios para la producción de trigo en Sudamérica. Debido al número reducido de fuentes de resistencia, la identificación de nuevas fuentes es de suma importancia. En este trabajo se evaluó la reacción de las variedades de trigo sembradas en Paraguay a la infección por *M. oryzae*. Treinta y dos variedades y cuatro líneas avanzadas del Programa Nacional de Investigación de Trigo del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria se inocularon con tres cepas, mediante aspersión, con una suspensión de 5×10^4 conidios mL⁻¹. La evaluación se realizó

Abstract. Wheat blast caused by *Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum* has become one of the most important crop production problems in South America. Given the availability of few sources of resistance, the identification of newer sources has become urgent. The present study was designed to evaluate the reaction of major wheat varieties grown in Paraguay to *M. oryzae* infection. Thirty-two wheat varieties and four advanced breeding lines were provided by the National Wheat Program of the Paraguayan Institute of Agrarian Technology. These varieties were spray inoculated with three isolates of *M. oryzae* using 5.10^4 conidia mL⁻¹. The disease reaction was evaluated on a severity scale of 0-4, 15 days after inoculation. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Considering the median rating of infection, the materials were classified as Resistant (0-1), Moderately Resistant (1.1-2), Moderately Susceptible (2.1-3) and Susceptible (3.1-4). The variety Canindé 1 was resistant to all isolates, and CD 116 was resistant to one and moderately resistance to two isolates. All the remaining varieties were susceptible

a los 15 días utilizando una escala de severidad de 0-4. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Con base en las medianas de severidad, los materiales se clasificaron como Resistentes (0-1), Moderadamente Resistentes (1.1-2), Moderadamente susceptibles (2.1-3) y Susceptibles (3.1-4). La variedad Canindé 1 fue resistente a las tres cepas, mientras CD 116 fue resistente a uno y moderadamente resistente a dos. Los demás genotipos fueron susceptibles y moderadamente susceptibles a las tres cepas, demostrando la susceptibilidad de las variedades sembradas en Paraguay y la necesidad de ampliar la base de resistencia en el programa nacional de mejoramiento.

Palabras clave: *Pyricularia*, resistencia, *Triticum*.

La piricularia o el brusone del trigo causado por *M. oryzae* patotipo *Triticum* (MoT), es uno de los problemas más serios para la producción de trigo en la región tropical/subtropical de Sudamérica. La enfermedad tuvo su primera aparición en el norte de Paraná, Brasil en 1985 (Igarashi *et al.*, 1986) y se identificó en Paraguay en 1989 (Cunfer *et al.*, 1993). Sin embargo, su primera epifitía se reportó en 2002, causando pérdidas mayores al 70% de la producción en campos sembrados tempranamente (Viedma y Morel, 2002). Las condiciones ambientales que desencadenan una epifitía son temperaturas de entre 18 a 25°C, acompañadas de alta humedad relativa durante la época de espigamiento y floración, por lo general coincidiendo con la prevalencia del fenómeno de El Niño (Kohli *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2017).

Considerando que la piricularia del trigo es una enfermedad de control difícil, su manejo debe integrar el uso de variedades resistentes junto a prácticas de control químico para disminuir las pérdidas. Sin embargo, el desarrollo de variedades ha sido

or moderately susceptible to the three isolates, showing the susceptibility of major wheat varieties grown in Paraguay, and an urgent need for widening the genetic basis of resistance to wheat blast disease in the National Wheat Breeding Program.

Key words: *Pyricularia*, resistance, *Triticum*.

Wheat blast or brusone caused by *Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum* (MoT) is one of the most serious problems for wheat production in the tropical/subtropical region of South America. The disease appeared for the first time in northern Paraná, Brazil in 1985 (Igarashi *et al.*, 1986) and was later detected in Paraguay in 1989 (Cunfer *et al.*, 1993). However, the first blast epidemic was reported in 2002 and caused production losses greater than 70% in early-sown fields (Viedma and Morel, 2002). The environmental conditions that favor blast epidemics are temperatures between 18 and 25°C and high relative humidity during heading and flowering, usually during the El Niño phenomenon (Kohli *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2017).

Given that wheat blast is a disease that is difficult to control, its management must include the use of resistant wheat varieties along with chemical control practices to reduce production losses. However, it has been difficult to develop resistant varieties due to the low number of available resistance sources. Some varieties derived from CIMMYT's Milan line have shown high levels of resistance to wheat blast (Kohli *et al.*, 2011). Recently, (Cruz *et al.*, 2016) determined that the 2NS translocation, derived from *Triticum ventricosum*, is responsible for conferring resistance to Milan and other derived varieties. For this reason, identifying different resistance sources and characterizing the reaction of new genotypes are considered of vital importance. This study was

difícil debido al número reducido de fuentes de resistencia disponibles. Algunas variedades derivadas de Milan, una línea del CIMMYT, han sido identificadas con altos niveles de resistencia a la enfermedad (Kohli *et al.*, 2011). Recientemente, (Cruz *et al.*, 2016) determinaron que la translocación 2NS cuyo origen es *Triticum ventricosum*, es responsable de la resistencia en Milan y otras variedades derivadas. Por tal motivo, la identificación de distintas fuentes de resistencia y la caracterización de la reacción de nuevos genotipos es considerada de vital importancia. Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la reacción de las variedades paraguayas de trigo, así como algunas líneas avanzadas desarrolladas en el país, y las principales variedades extranjeras sembradas actualmente en Paraguay a la infección de *Magnaporthe oryzae*.

El ensayo se realizó en el invernadero del Centro de Investigación Hernando Bertoni, Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, IPTA, Caacupé, Paraguay, ubicado en latitud Sur 25°23'25.314", longitud Oeste 57°11'27.848". Se utilizaron 32 variedades, y cuatro líneas avanzadas de trigo, que fueron proveídas por el Programa Nacional de Investigación de Trigo del IPTA (Cuadro 1), todas sembradas actualmente en Paraguay. Estas variedades se sembraron el 12 de abril de 2016, en macetas de plástico de 15x25 cm, que contenían un sustrato compuesto por suelo y mantillo de hojas en la proporción 3:1, a razón de dos plantas por maceta, se sembraron cuatro macetas de cada variedad, para cada cepa del hongo, cada maceta se consideró como una repetición. La temperatura del invernadero se mantuvo a 15 ± 2°C, y el manejo agronómico, consistió en una fertilización con fertilizante 15-15-15, a razón de 5 gramos por maceta, 15 días luego de la emergencia, más una fertilización con urea a los 45 días de la emergencia, en la misma cantidad; los riegos se realizaron dos veces por semana, y se monitoreó semanalmente

conducted to evaluate the reaction of Paraguayan wheat varieties to *Magnaporthe oryzae* infection, as well as that of several advanced lines developed in the country and the main foreign varieties currently sown in Paraguay.

The trial was conducted in the greenhouse of the Centro de Investigación Hernando Bertoni, Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, (IPTA) in Caacupé, Paraguay (south latitude 25°23'25.314", west longitude 57°11'27.848"). The trial included 32 wheat varieties and four advanced lines provided by the IPTA's Programa Nacional de Investigación de Trigo (Table 1), all of them currently sown in Paraguay. The varieties were sown on 12 April 2016 in 15x25 cm plastic pots containing a substratum made up of soil and leaf mulch at a 3:1 ratio. Two plants per pot were sown for each fungus isolate, and four pots were planted for each variety. Each pot was considered a replication. The greenhouse was kept at a temperature of 15 ± 2°C, and the agronomic management consisted of one 15-15-15 fertilizer application at a dose of 5 g per pot 15 days after emergence, plus one application of urea 45 days after emergence using the same amount. Irrigation was applied twice a week, and the plants were monitored on a weekly basis to detect pests. *Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum* (MoT) isolates used in the study were taken from infected wheat spikes collected in the field, as follows: P13-009 was collected in Capitán Miranda, Itapúa, in the 2013 cycle; P14-025, in Yhovy, Canindeyú, in the 2014 cycle; and P14-039, in La Flor farm, Alto Paraná, in 2014. These isolates were selected based on their virulence in previous trials and on their places of origin, which represent the main wheat production areas in Paraguay. The isolates were kept on filter paper at -18 °C as part of the isolates collection of the *Pyricularia* in Wheat Project. They were replicated in Petri dishes containing oatmeal flour agar culture medium and incubated

Cuadro 1. Variedades y líneas de trigo utilizadas en el estudio, con su genealogía y días a la espigazón.
Table 1. Wheat varieties and lines used in the present study, including their genealogy and days to heading.

| Variedad | Genealogía | Espigazón (días) |
|--------------------------------|---|------------------|
| Itapua 40 ^a | BOBWHITE/GENARO 81 | 73 |
| Itapúa 70 ^a | RAYON//VEERY#6/TRAP1 | 72.5 |
| Itapúa 75 ^a | VEERY'S''/RL6010/JUP73/3/PRL'S'/VEE#6//MYNA/VULTURE | 78.5 |
| Itapúa 80 ^a | WEEBILL1*2/TUKURU | 69 |
| Itapúa 85 ^a | MILVUS1/ITAPUA 60 | 75.5 |
| Canindé 1 ^a | MILAN/MUNIA | 71 |
| Canindé 3 ^a | ITAPUA35/PF84432//CORDILLERA4 | 73 |
| Canindé 11 ^a | BABAX/4/BOBWHITE/CROW//BUCBUC/PVN/3/VEERY#10/5/BABAX | 71 |
| Canindé 12 ^a | BABAX//PARULA/VEERY#10/3/BABAX/4/BABAX | 70 |
| Canindé 13 ^a | BABAX*3//PARULA/VEERY#10 | 69.5 |
| Canindé 21 ^a | E 92225/FUNDACEP 30 | 79.5 |
| E 97034/ITAPUA 45 ^a | E 97034/ITAPUA 45 | 71 |
| ITAPUA 40 /IAN 10 ^a | ITAPUA 40 /IAN 10 | 74 |
| ITAPUA75/WEBILL2 ^a | ITAPUA 75/WEBILL2 | 74 |
| E92225/FUNDACEP30 ^a | E 92225/FUNDACEP30 | 75.5 |
| BRS 208 ^b | CPAC89118/3/BR23//CEP19/PF85490 | 73 |
| BRS 220 ^b | EMBRAPA16/TB108 | 71.5 |
| GRALHA AZUL ^b | JUPATECO F73/EMBRAPA16//BRS CAMBOATÁ/LR37 | 76.5 |
| BRS Pardela ^b | TRIGO BR18/PF 9099 | 73 |
| BRS Tangara ^b | BR 23*2/PF 940382 | 75 |
| CD 104 ^b | PFAU'S''/IAPAR17 | 77.5 |
| CD 108 ^b | TAM200/TURACO | 66 |
| CD 116 ^b | MILAN/MUNIA | 71.5 |
| CD 150 ^b | CD 104/CD 108 | 69 |
| CD 154 ^b | CD 104/CDI 200104 | 70.5 |
| IPR 144 ^b | SERI*3/BUCBUC/5/BOBWHITE/3/CAR853/COCORAQUE//VEERY/4/OC22 | 78 |
| IPR Catuara ^b | LD875/IAPAR85 | 71 |
| IPR 85 ^b | IAPAR30/TRIGOBR18 | 70 |
| LE 2331 ^b | INIA TIJERETA/LE 2229 | 80.5 |
| QUARZO ^b | ONIX/AVANTE | 79 |
| TBIO Iguazu ^b | QUARZO//SAFIRA | 81 |
| TBIO Toruk ^b | MIRNTE/IBIO0901//QUARZO | 80.5 |
| TBIO Sintonía ^b | Marfim/Quarzo//Marfim | 79.5 |
| TBIO Mestre ^b | IBIO0810/Cronox//ORL00255 | 80.5 |
| FUNDACEP 6219 ^b | GENEOLOGIA CERRADA | 74.5 |
| FUNDACEP RAICES ^b | EMB 27//CEP 24/3/BUC'S''/FCT'S''//PF 85229 | 76 |

^a Variedades y líneas paraguayas / ^a Paraguayan wheat varieties and lines.

^b Variedades extranjeras sembradas actualmente en Paraguay / ^b Foreign varieties currently sown in Paraguay.

para detectar la aparición de plagas. Las cepas de MoT utilizadas en el estudio se aislaron a partir de espigas de trigo enfermas recolectadas en campo. Estas fueron P13-009, colectada en Capitán Miranda, Itapúa durante el ciclo 2013; P14-025 colectada

for 10 days at 25°C and a 12-h photoperiod. The mycelium was later crushed using an L-shaped glass rod, and the dishes were exposed to continuous fluorescent light for three days to favor sporulation. Then, the spores were removed using a paint brush

en Yhovy, Canindeyú, 2014 y P14-039, colectada en la Estancia Flor, Alto Paraná, en 2014; se seleccionaron con base en su virulencia en ensayos previos y a su origen, que representan las tres principales zonas de producción de trigo en Paraguay. Las cepas se encontraban conservadas en el cepario del Proyecto *Pyricularia* en Trigo, sobre papel de filtro a -18°C . Fueron repicadas a cajas de Petri con medio de cultivo Harina de Avena-Agar y se incubaron durante 10 días a 25°C y fotoperiodo de 12 horas. Posteriormente, el micelio se aplastó con una varilla de vidrio con forma de L, y las placas se expusieron a luz fluorescente continua durante tres días, para favorecer la esporulación. Posteriormente las esporas se removieron con ayuda de un pincel y agua destilada esterilizada (Marangoni *et al.*, 2013). La concentración de conidios se ajustó utilizando un hemacitómetro Neubauer, a 5×10^4 conidios ml^{-1} , utilizando para la dilución agua destilada esterilizada (Chávez *et al.*, 2015). La inoculación se realizó a medida que cada variedad alcanzó el estadio 59 de la escala de Zadok, es decir, cuando las espigas se encontraban completamente fuera de la hoja bandera, mediante aspersión con un aspersor manual (tres aspersiones por espiga). Luego de asperjadas las espigas, las plantas se mantuvieron en una sala climatizada dentro del invernadero, en oscuridad por 24 horas con $80 \pm 5\%$ de humedad y $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura para favorecer la infección. Trascorrido ese tiempo, las plantas se retiraron de la sala climatizada y se mantuvieron a la misma temperatura, a humedad de $60 \pm 5\%$, con un fotoperiodo de 12 h dentro del invernadero. La observación de síntomas y evaluación se realizó 15 días después de la inoculación. Se evaluó la severidad de la infección en las espigas, adaptando la escala propuesta por Tagle *et al.* (2014). Esta escala clasifica los síntomas de la siguiente manera: 0 = Sin infección; 1 = Lesiones pequeñas, < 1.5 mm; 2 = Lesiones de tamaño intermedio, < 3 mm; 3 =

and sterile distilled water (Marangoni *et al.*, 2013). The conidia concentration was adjusted with a Neubauer hemacytometer at 5×10^4 conidia ml^{-1} by adding sterile distilled water to dilute it (Chávez *et al.*, 2015). Inoculation was performed when each variety reached stage 59 on Zadok's scale, this is, when the spikes were completely out of the flag leaf sheath. Spikes were sprayed using a manual sprayer (three sprayings per spike). After the spikes were sprayed, the plants were kept in darkness for 24 h, at $80 \pm 5\%$ moisture and $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperature in a heated room in the greenhouse to favor infection. After that period, the plants were removed from the heated room and kept in the greenhouse, at the same temperature, $60 \pm 5\%$ moisture and 12-h photoperiod. Symptoms were observed and evaluated 15 days after inoculation. The scale proposed by Tagle *et al.* (2014) was adapted to evaluate infection severity on the spikes. This scale classifies symptoms as follows: 0 = no infection; 1 = small lesions, < 1.5 mm; 2 = intermediate lesions, < 3 mm; 3 = mixture of green and white glumes, without apparent necrosis, caused by a hypersensitive reaction; 4 = complete spike necrosis. Data were analyzed using Kruskal-Wallis' test and the INFOSTAT (version 2016e) statistical program. Based on the infection means, on which the test is based, the genetic materials were classified as Resistant (0-1), Moderately resistant (1.1-2), Moderately susceptible (2.1-3) and Susceptible (3.1-4).

Significant statistical differences were found between the varieties and their interaction with the inoculated isolates (Table 2). For the P13-009 isolate, two varieties (Canindé 1, CD 116) were classified as resistant; three were moderately resistant (TBIO Toruk, TBIO Iguazu, TBIO Sintonía), and the rest were moderately susceptible and susceptible. For the P14-025 and P14-039 isolates only one variety was classified as resistant

Mezcla de glumas verdes y blancas, sin necrosis aparente, causado por una reacción de hipersensibilidad; 4 = Espiga completamente necrosada. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, utilizando el programa estadístico INFOSAT (versión 2016e). Teniendo en cuenta las medianas de infección, en las cuales se basa la prueba, se clasificaron los materiales genéticos como Resistentes (0-1), Moderadamente Resistentes (1.1-2), Moderadamente susceptibles (2.1-3) y Susceptibles (3.1-4).

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las variedades y su interacción con las cepas inoculadas (Cuadro 2). Para la cepa P13-009, dos variedades (Canindé 1, CD 116) se clasificaron como resistentes; tres moderadamente resistentes

(Canindé 1), and two were moderately resistant (CD 116 and TBIO Sintonía). The rest were classified as moderately susceptible and susceptible. As for the Paraguayan varieties, Canindé 1 was the only one classified as resistant to the three inoculated isolates, while Itapúa 75 that was inoculated with isolate P14-025, and Canindé 3, with isolates P13-009 and P14-039, were moderately susceptible. The remaining varieties, as well as the four advanced lines evaluated, were susceptible. The interaction among varieties and the fungus isolates used is limited to intermediate cases, in which a variety classified as moderately resistant to an isolate shows a moderately susceptible reaction to another isolate, and vice versa (TBIO Iguazú, TBIO Toruk: MR P13-009; MS P14-025). This kind of interaction

Cuadro 2. Clasificación de la reacción de las variedades y líneas de trigo, a las tres cepas de *Magnaporthe oryzae* estudiadas, de acuerdo a la mediana, rankeadas según la Prueba de Kruskal-Wallis.

Table 2. Classification of wheat varieties and lines resistance to three *Magnaporthe oryzae* isolates, according to means and ranked using Kruskal-Wallis' test.

| Genotipo | Cepa | Mediana | Clasificación | Ranks | | | | | | | | |
|-----------------|---------|---------|---------------|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Canindé 1 | P13-009 | 1 | R | 19* | A | | | | | | | |
| CD 116 | P13-009 | 1 | R | 36.25 | A | | | | | | | |
| Canindé 1 | P14-039 | 1 | R | 40.38 | A | | | | | | | |
| TBIO Iguazu | P13-009 | 2 | MR | 47.75 | A | B | | | | | | |
| Canindé 1 | P14-025 | 1 | R | 51.88 | A | B | | | | | | |
| TBIO Sintonía | P13-009 | 2 | MR | 53.5 | A | B | | | | | | |
| TBIO Sintonía | P14-039 | 1.5 | MR | 57.63 | A | B | | | | | | |
| CD 116 | P14-039 | 2 | MR | 59.25 | A | B | | | | | | |
| CD 116 | P14-025 | 2 | MR | 59.25 | A | B | | | | | | |
| TBIO Sintonía | P14-025 | 2 | MR | 90.5 | A | B | C | | | | | |
| TBIO Toruk | P13-009 | 2 | MR | 111.88 | A | B | C | | | | | |
| TBIO Toruk | P14-025 | 2.5 | MS | 127.5 | A | B | C | | | | | |
| TBIO Toruk | P14-039 | 3 | MS | 158.75 | A | B | C | D | | | | |
| CD 108 | P13-009 | 3 | MS | 190 | A | B | C | D | E | | | |
| FUNDACEP RAICES | P14-025 | 3 | MS | 238.25 | A | B | C | D | E | F | | |
| LE 2331 | P14-025 | 3 | MS | 255.25 | A | B | C | D | E | F | | |
| FUNDACEP 6219 | P14-039 | 3 | MS | 286.5 | | B | C | D | E | F | G | |
| QUARZO | P13-009 | 3 | MS | 286.5 | | B | C | D | E | F | G | |
| BRS 220 | P14-025 | 3 | MS | 286.5 | | B | C | D | E | F | G | |
| Itapúa 75 | P14-025 | 3 | MS | 320.5 | | | C | D | E | F | G | |
| Canindé 3 | P13-009 | 3 | MS | 334.75 | | | C | D | E | F | G | H |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------|---------|-----|----|--------|---|---|---|---|---|---|
| Canindé 3 | P14-039 | 3 | MS | 334.75 | C | D | E | F | G | H |
| FUNDACEP RAICES | P13-009 | 3 | MS | 334.75 | C | D | E | F | G | H |
| IPR Catuara | P13-009 | 3 | MS | 334.75 | C | D | E | F | G | H |
| CD 150 | P13-009 | 3 | MS | 334.75 | C | D | E | F | G | H |
| TBIO Iguazu | P14-025 | 3 | MS | 334.75 | C | D | E | F | G | H |
| Itapúa 85 | P14-039 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| TBIO Iguazu | P14-039 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| BRS Pardela | P13-009 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| QUARZO | P14-025 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| IPR85 | P14-039 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| Canindé 21 | P13-009 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| Canindé 13 | P14-025 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| IPR Catuara | P14-025 | 3.5 | S | 383 | | D | E | F | G | H |
| QUARZO | P14-039 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| ITAPUA 40 /IAN 10 | P14-039 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| IPR 144 | P14-025 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| Itapúa 70 | P14-039 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| E 97034/ITAPUA 45 | P14-025 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| FUNDACEP RAICES | P14-039 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| IPR Catuara | P14-039 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| IPR85 | P14-025 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| GRALHA AZUL | P14-025 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| E 97034/ITAPUA 45 | P14-039 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| Canindé 21 | P14-039 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| CD 108 | P14-025 | 4 | S | 431.25 | | | E | F | G | H |
| BRS 208 | P14-039 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| Canindé 21 | P14-025 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| Canindé 11 | P14-039 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| Itapúa 70 | P14-025 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| IPR85 | P13-009 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| Canindé 3 | P14-025 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| CD 154 | P14-039 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| Itapúa 85 | P14-025 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| TBIO Mestre | P13-009 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| FUNDACEP 6219 | P13-009 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| CD 150 | P14-025 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| ITAPUA 75/WEBILL2 | P14-039 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| TBIO Mestre | P14-025 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| BRS Tangara | P14-025 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| CD 108 | P14-039 | 4 | S | 479.5 | | | | F | G | H |
| Canindé 13 | P13-009 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| Itapúa 40 | P14-039 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| Itapúa 85 | P13-009 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| ITAPUA 40 /IAN 10 | P14-025 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| Canindé 13 | P14-039 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| BRS Pardela | P14-025 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| BRS 220 | P13-009 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| LE 2331 | P14-039 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| BRS 208 | P14-025 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| Canindé 12 | P14-025 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| Canindé 12 | P13-009 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| E92225/FUNDACEP30 | P14-025 | 4 | S | 527.75 | | | | | G | H |
| BRS 220 | P14-039 | 4 | S | 576 | | | | | | H |

| | | | | | |
|-------------------|---------|---|---|-----|---|
| TBIO Mestre | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 75 | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 80 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| BRS 208 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| LE 2331 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| BRS Pardela | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 80 | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 80 | P14-025 | 4 | S | 576 | H |
| CD 154 | P14-025 | 4 | S | 576 | H |
| CD 154 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| CD 150 | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| E 97034/ITAPUA 45 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| E92225/FUNDACEP30 | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| E92225/FUNDACEP30 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| BRS Tangara | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| CD 104 | P14-025 | 4 | S | 576 | H |
| CD 104 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| Canindé 12 | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| Canindé 11 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| Canindé 11 | P14-025 | 4 | S | 576 | H |
| CD 104 | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 70 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 40 | P14-025 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 40 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| Itapúa 75 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| ITAPUA 75/WEBILL2 | P14-025 | 4 | S | 576 | H |
| ITAPUA 75/WEBILL2 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| ITAPUA 40 /IAN 10 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| GRALHA AZUL | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| BRS Tangara | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| FUNDACEP 6219 | P14-025 | 4 | S | 576 | H |
| IPR 144 | P14-039 | 4 | S | 576 | H |
| IPR 144 | P13-009 | 4 | S | 576 | H |
| GRALHA AZUL | P14-039 | 4 | S | 576 | H |

*Medianas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) / *Means with common letters are not significantly different ($p > 0.05$).

H = 368,57 $p < 0.0001$ / H = 368,57 $p < 0.0001$.

R=Resistente, MR=Moderadamente resistente, MS= Moderadamente susceptible, S= Susceptible / R=Resistant, MR=Moderately resistant, MS= Moderately susceptible, S= Susceptible.

(TBIO Toruk, TBIO Iguazu, TBIO Sintonía), y las demás fueron moderadamente susceptibles y susceptibles. Para las cepas P14-025 y P14-039 solo una variedad fue clasificada resistente (Canindé 1), y dos moderadamente resistentes (CD 116 y TBIO Sintonía). El resto de las variedades se clasificaron como moderadamente susceptibles y susceptibles. En cuanto a las variedades paraguayas, Canindé 1, fue la única clasificada como resistente a las tres

among wheat varieties and *Magnaporthe* isolates shows the specific reactions between the host and the pathogen that must be thoroughly studied in the future.

It should be noted that Canindé 1 was resistant to the three pathogen isolates, while CD 116, its sister line derived from the same genealogy, was resistant to one of the isolates (P13-009) and moderately resistant to the other two (P14-025 and P14-039).

cepas inoculadas; mientras que Itapúa 75 con la cepa P14-025, y Canindé 3 con las cepas P13-009 y P14-039, fueron moderadamente susceptibles; las demás, al igual que las cuatro líneas avanzadas evaluadas fueron susceptibles. La interacción entre variedades y los aislados del hongo utilizados se limita a los casos intermedios, donde una variedad clasificada como moderadamente resistente para una cepa muestra la reacción moderadamente susceptible para otra cepa y viceversa (TBIO Iguazú, TBIO Toruk: MR P13-009; MS P14-025). Este tipo de interacción entre variedades de trigo y cepas de *Magnaporthe* señalan la especificidad de reacciones entre el huésped y patógeno que debe ser investigada detalladamente en el futuro.

Es interesante observar que Canindé 1, se mostró resistente a las tres cepas del patógeno, mientras que su línea hermana, derivada de la misma genealogía, CD 116, fue resistente a una de las cepas (P13-009) y moderadamente resistente a las otras dos (P14-025 y P14-039). Considerando que las dos variedades son derivadas de la línea Milan, poseedora del segmento 2NS, que confiere resistencia a la enfermedad (Kohli *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2016), la diferencia de reacción entre ellas puede ser explicada por su fondo genético, que puede variar en el proceso de selección de una progenie. También es importante destacar la moderada resistencia de la variedad TBIO Sintonía, a las tres cepas utilizadas. La reacción susceptible y/o moderadamente susceptible en la mayor parte de las variedades de trigo sembradas en el Paraguay podría ser una señal de alerta sobre la probabilidad de una epifitía fuerte bajo condiciones favorables. La evaluación bajo condiciones controladas tiene su valor como referencia en los trabajos de mejoramiento genético para seleccionar materiales resistentes a esta enfermedad; sin embargo, es posible que en condiciones de campo la reacción de estas variedades sea diferente. Ésta diferencia en el

Considering that both varieties are derived from the Milan line, which contains the 2NS segment that confers resistance to the disease (Kohli *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2016), the difference in their reactions is due to their genetic background, which can vary during the process of selecting a progeny. It is also important to highlight the moderate resistance of the TBIO Sintonía variety to the three isolates used. The susceptible and/or moderately susceptible reaction of most wheat varieties sown in Paraguay could be a warning that strong epidemics could occur under favorable conditions. Evaluation under controlled conditions is valuable as a reference for genetic improvement activities aimed at selecting resistant materials to wheat blast mildew, but it is possible that the varieties may react differently under field conditions. The difference in the varieties' performance under field conditions and when inoculated in the greenhouse has already been observed by Igarashi (1990) and Urashima and Kato (1994) and is attributed to the pathogenic variability of the fungus (Urashima *et al.*, 2004). In Paraguay, Kohli *et al.* (2012) reported the reaction of varieties Canindé 3, Canindé 11, Canindé 12, Canindé 13, Itapúa 40 and Itapúa 70 as moderately susceptible to susceptible in the field, while Canindé 1 and Itapúa 75 were moderately resistant. Except for Itapúa 75, a long-cycle variety, the reactions observed in the field coincided with those observed in this study under controlled greenhouse conditions. In Brazil, Fronza *et al.* (2016) observed that varieties QUARTZO, FUNDACEP RAICES, BRS 220 and IPR 85 are moderately resistant under field conditions. In the present study, these varieties were classified as moderately susceptible and susceptible to the three isolates. However, both studies agree on the resistance of variety CD 116. Considering that environmental conditions play an important role in the expression of the disease in the field, it is necessary to evaluate the resistance

comportamiento de las variedades en condiciones de campo y al ser inoculadas en invernadero, ya fue observada por Igarashi (1990) y Urashima y Kato (1994), la cual se atribuye a la variabilidad patogénica del hongo (Urashima *et al.*, 2004). En Paraguay, Kohli *et al.* (2012), reportan la reacción a campo de las variedades Canindé 3, Canindé 11, Canindé 12, Canindé 13, Itapúa 40 e Itapúa 70, como moderadamente susceptible a susceptible, mientras que Canindé 1 e Itapúa 75 son moderadamente resistentes. Con excepción de Itapúa 75, una variedad de ciclo largo, las reacciones observadas en campo coincidieron con aquellas observadas en este trabajo con condiciones controladas de invernadero. En Brasil, Fronza *et al.* (2016), observaron que las variedades QUARTZO, FUNDACEP RAICES, BRS 220 e IPR 85 son moderadamente resistentes en condiciones de campo. En el presente estudio, estas variedades se clasificaron como moderadamente susceptibles y susceptibles a las tres cepas. Sin embargo, los dos estudios coinciden en la resistencia de la variedad CD 116. Considerando que las condiciones ambientales juegan un papel importante en la expresión de la enfermedad en el campo, es necesario evaluar la resistencia de los materiales genéticos, controlando el espectro de condiciones ambientales y ampliando la variabilidad del patógeno bajo condiciones controladas.

El estudio expone la susceptibilidad de una gran mayoría de las variedades de trigo sembradas en Paraguay, tanto nacionales como extranjeras, que pueden ser vulnerables a una epifitía severa de la enfermedad bajo condiciones favorables; además muestra los primeros indicios de las interacciones que pueden existir entre las variedades de trigo y distintas cepas del hongo *Magnaporthe oryzae* patotipo *Triticum*. Por este motivo, es urgente identificar e introducir nuevas fuentes de resistencia en el programa de mejoramiento con el fin de ampliar el número de variedades resistentes en el futuro.

of genetic materials while controlling the spectrum of environmental conditions and widening the pathogen's variability under controlled conditions.

This study shows the susceptibility of most of the wheat varieties sown in Paraguay, both local and foreign, which means that they would be vulnerable to severe wheat blast epidemics under favorable conditions. It also shows the first evidence of the interactions that may exist between wheat varieties and different isolates of the *Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum* fungus. For this reason, it is urgent to identify and introduce new resistance sources in the improvement program in order to increase the number of resistant varieties in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-Paraguay for their financial support through the PROCENCIA Program.

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

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Paraguay por el apoyo económico brindado a través del Programa PROCENCIA.

#### LITERATURA CITADA

Chávez A, Cazal C, Rojas A, Guillén A, Núñez A y Kohli M. 2015. Evaluación de la concentración de conidios para la inoculación de materiales de trigo con *Magnaporthe grisea*. Pp:168-169. In: Memorias del I Congreso Agrario del IPTA. Trabajos de investigación. Encarnación, Paraguay. Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria. Disponible en línea: <https://bibliotecadeamag.wikispaces.com/file/view/TRABAJOS+DE+INVESTIGACION%3%93N.pdf>

- Cruz CD, Peterson GL, Bockus WW, Kankanala P, Dubkovsky J, Jordan KW, Akhunov E, Chumley F, Baldelomar FD and Valent B. 2016. The 2NS translocation from *Aegilops ventricosa* confers resistance to the *Triticum* pathotype of *Magnaporthe oryzae*. *Crop Science* 56:990-1000. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5087972/pdf/nihms825306.pdf>
- Cunfer BM, Yorinori T and Igarashi S. 1993. Wheat blast. Pp:125-128. *In*: Mathur SB, Cunfer BM (eds.). Seed borne diseases and seed health testing of wheat. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen.
- Cunha, JMF, Nicolau M, Pavan WM, Amaral C, Karrei M, de Vargas F, Boeira JL, Tagliari A and Tsukahara R. 2017. A weather-based model for predicting early season inoculum build-up and spike infection by the wheat blast pathogen. *Tropical plant pathology* 42: 230-237. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-017-0164-2>
- Fronza V, Moresco ER, Maciel JLN, Silva MS, Scheeren PL and Soares Sobrinho J. 2016. Reaction of Brazilian wheat cultivars to wheat blast in the Cerrado Región. Pp:142. *In*: Madeiros Del Ponte E, Bergstrom G, Pavan W, Lazzaretti A, Cunha Fernandes JM. (eds.) Book of Abstracts. 5<sup>th</sup> International Symposium on Fusarium head blight. 2<sup>nd</sup> International Workshop on Wheat Blast. Universidade de Paso Fundo, RS. BR. Disponible en línea: <http://mosaico.upf.br/~events/scabandblastofwheat-book.pdf>
- Igarashi S, Utimada C.M, Igarashi LC, Kazuma AE e Lopes RC. 1986. *Pyricularia* sp. em trigo. I. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 11:351-352.
- Igarashi, S. 1990. Update on wheat blast (*Pyricularia oryzae*) in Brazil. Pp:480-483. *In*: Saunders, DA (Ed.) Proceeding of the International Conference-Wheat for the nontraditional warm areas. CIMMYT. México, MX.
- Kohli MM, Mehta YR, Guzman, E, Viedma L and Cubilla L. 2011. *Pyricularia* blast- A threat to wheat cultivation. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 47:S130-S134. (Special Issue). Disponible en línea: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/48968.pdf>
- Kohli M, Cabrera G y Cubilla L. 2012. Guía práctica para el manejo y la producción de Trigo. IPTA/CAPECO/INBIO. 52 p. Disponible en línea: [http://www.inbio.org.py/uploads/Gui%CC%81a\\_pra%CC%81etica\\_para\\_el\\_manejo\\_y\\_la\\_produccio%CC%81n\\_de\\_trigo\\_2012.pdf](http://www.inbio.org.py/uploads/Gui%CC%81a_pra%CC%81etica_para_el_manejo_y_la_produccio%CC%81n_de_trigo_2012.pdf)
- Marangoni M, Nunes M, Fonseca N and Metha Y. 2013. *Pyricularia* blast on white oats: a new threat to wheat cultivation. *Tropical Plant Pathology* 38:198-202. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013005000004>
- Tagle AG, Chuma I and Tosa Y. 2014. Rmg7, a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* identified in tetraploid wheat. *Phytopathology* 105:495-499. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0182-R>
- Urashima AS and Kato H. 1994. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. *Summa Phytopathologica* 20:107-112.
- Urashima AS, Lavorent NA, Goulart ACP and Metha YR. 2004. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 29:511-518. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000500007>
- Viedma LQ y Morel W. 2002. Añublo o Piricularia del Trigo. Díptico. MAG/DIA/CRIA. Programa de Investigación de Trigo, CRIA, Capitán Miranda, Itapúa.



# Anatomic alterations and hyperplasia induced by *Euphorbia mosaic virus* Yucatan Peninsula isolate at the mesophyll

## Alteraciones anatómicas e hiperplasia inducidas por *Euphorbia mosaic virus* aislamiento Yucatán Península en el mesófilo

Naivy Gamboa-Tec, Angela Kú-González, Luis Carlos Gutiérrez-Pacheco, Enrique Castaño, Luisa López-Ochoa\*, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo CP. 97200. Mérida, Yucatán. México. \*Autor para correspondencia: luisa\_lopez@cicy.mx.

Recibido: 05 de Diciembre, 2017.

Aceptado: 05 de Febrero, 2018.

Gamboa-Tec N, Kú-González A, Gutiérrez-Pacheco LC, Castaño E, López-Ochoa L. 2018. Anatomic alterations and hyperplasia induced by *Euphorbia mosaic virus* Yucatan Peninsula isolate at the mesophyll. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 287-297.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-2

Primera publicación DOI: 09 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 09, 2018.

**Resumen.** *Euphorbia mosaic virus* aislamiento Yucatan Peninsula es un begomovirus bipartita con una amplia gama de hospedantes experimentales, que incluyen especies de importancia económica, como frijol, chile y tomate, entre otras. Este virus provocó síntomas severos en hojas de *Nicotiana benthamiana*, pérdida de identidad celular y tisular, deformaciones de la lámina foliar y de la nervadura central, cambios en la estructura del mesófilo y proliferación celular, a diferencia de otros begomovirus bipartitas. Activó la expresión de los genes *cycA1*, *cycA2* y *cdkB2.2*, implicados en la

**Abstract.** *Euphorbia mosaic virus* isolated from the Yucatan Peninsula is a bipartite begomovirus with a wide range of experimental hosts, including species of economic importance, such as bean, chilli and tomato, among others. This virus produced severe symptoms on *Nicotiana benthamiana* leaves, leaf blade deformations, loss of tissue and cell identity, as well as changes in the mesophyll structure. Unlike other bipartite begomoviruses, EuMV-YP induced cell proliferation at the mesophyll; it also positively regulated the expression of *cycA1*, *cycA2* and *cdkB2.2*, genes involved in the G2/M transition of the mitotic cell cycle, and localized at the mesophyll. This is the first example of a bipartite begomovirus capable of inducing cell proliferation.

**Key words:** geminivirus; cell cycle.

*Euphorbia mosaic virus*, isolated from the Yucatan Peninsula (EuMV-YP) is a bipartite begomovirus with a wide range of experimental

transición G2/M del ciclo celular mitótico y se localizó en el mesófilo de las hojas. EuMV-YP es el primer ejemplo de un begomovirus bipartita capaz de inducir la proliferación celular.

**Palabras clave:** geminivirus; ciclo celular.

*Euphorbia mosaic virus* aislamiento Yucatan Peninsula (EuMV-YP) es un begomovirus bipartita con una amplia gama de hospedantes experimentales. El silenciamiento génico inducido por EuMV-YP en *Nicotiana benthamiana* inicia en las nervaduras y se extiende hacia el resto de la hoja (Villanueva *et al.*, 2013), lo que sugiere que es capaz de alcanzar el mesófilo. La mayoría de los begomovirus bipartitas tienen hospedantes específicos, en los cuales permanecen restringidos al floema. El *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) y el *African cassava mosaic virus* (ACMV) pueden invadir el mesófilo. Existe una correlación en su capacidad de salir del floema y la de producir síntomas severos en *N. benthamiana* (Wege *et al.*, 2001). La replicación de los geminivirus ocurre en el núcleo de las células diferenciadas, para ello inducen su entrada al ciclo celular. Los begomovirus bipartitas y los mastrevirus promueven la síntesis de ADN sin pasar por la división celular (revisado por Hanley *et al.*, 2013); mientras que los curtovirus inducen la mitosis, produciendo verrugas en la nervadura central (Park *et al.*, 2004; Latham *et al.*, 1997). En este trabajo se abordó la pregunta de si EuMV-YP es capaz de infectar las células del mesófilo de *N. benthamiana* y si su localización correlaciona con la severidad de los síntomas producidos. Para inocular con el virus silvestre se emplearon clones infectivos construidos previamente (Villanueva *et al.*, 2013), para localizar al virus se construyó el vector de expresión pEuMV-YPDAV1:GFP. Las combinaciones de plásmidos utilizados por tratamiento se

hosts. The gene silencing induced by EuMV-YP in *Nicotiana benthamiana* begins in the midribs and extends to the rest of the leaf (Villanueva *et al.*, 2013), which indicates that it is capable of reaching the mesophyll. Most bipartite begomoviruses have specific hosts in which they are restricted to the phloem. The *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) and the *African cassava mosaic virus* (ACMV) can invade the mesophyll. There is a correlation in its capability to exit the phloem and to produce severe symptoms in *N. benthamiana* (Wege *et al.*, 2001). The replication of geminiviruses takes place in the nuclei of differentiated cells, and for this, they induce their entry into the cell cycle. The bipartite begomoviruses and mastreviruses promote DNA synthesis without undergoing cell division (revised by Hanley *et al.*, 2013); whereas curtoviruses induce mitosis, producing enations in the leaves midribs (Park *et al.*, 2004; Latham *et al.*, 1997). This investigation posed the question of whether EuMV-YP is able to reach cells of the *N. benthamiana* mesophyll and if its tissue tropism correlates with the severity of the symptoms produced. To inoculate with the wild virus, previously constructed infective clones were used (Villanueva *et al.*, 2013), and to locate the virus, expression vector pEuMV-YPDAV1:GFP was constructed. The combinations of plasmids used per treatment are indicated in Table 1. In each treatment, 20 *N. benthamiana* plants with four true leaves were inoculated, as reported previously (Villanueva *et al.*, 2013); in this investigation, a pressure of 70 psi was applied at a distance of 6 cm, as well as 1  $\mu\text{m}$  gold particles covered with 5  $\mu\text{g}$  of each plasmid. Fifteen days post inoculation (dpi), leaves number nine and 10 were harvested. They were named “systemic leaves,” in this manuscript, since they emerged after inoculation. Paraffin inclusions of fixed tissues, and 8-10  $\mu\text{m}$  transversal cuts of the center of the leaves were

indican en el Cuadro 1. En cada tratamiento se inocularon 20 plantas de *N. benthamiana* de cuatro hojas verdaderas, como se reportó previamente (Villanueva *et al.*, 2013), en este trabajo se aplicó una presión de 70 psi a 6 cm de distancia y partículas de oro de 1 µm recubiertas con 5 µg de cada plásmido. A los 15 días después de la inoculación (ddi) se recolectaron las hojas número nueve y 10, denominadas “hojas con infección sistémica” porque emergieron después de la inoculación. Estas se fijaron y se embebieron en parafina, se hicieron cortes transversales de 8-10 µm en el centro de las hojas tal como se reportó previamente (Moo *et al.*, 2012). Se adquirieron imágenes con el objetivo 40x de un microscopio confocal láser modelo Olympus FV100 SW y se procesaron con el software FV10 ASW versión 4.1. La fluorescencia de GFP se capturó con longitudes de onda de excitación/emisión de 488/507 nm, respectivamente. Para el análisis histológico, las secciones se tiñeron con azul de toluidina. Se registraron imágenes de secciones transversales y de la región media de las hojas con infección sistémica con el objetivo 6.5x de un microscopio Eclipse E200 Nikon. Se midió el grosor de la hoja y se contó el número de células por mm<sup>2</sup> de cuatro plantas con síntomas moderados o severos a los 15 ddi. Se graficó el número de células y

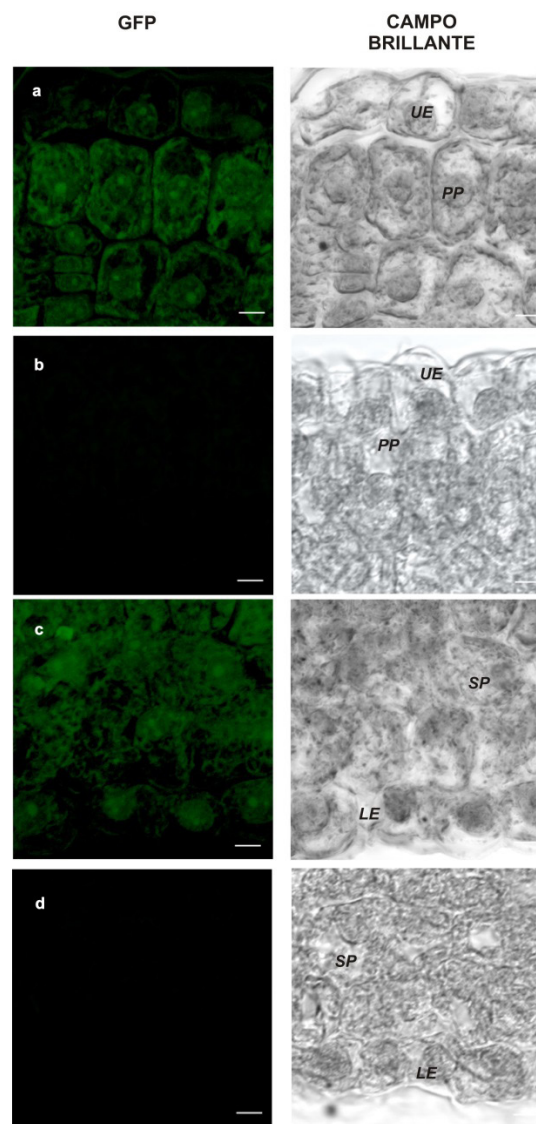
made, as reported previously (Moo *et al.*, 2012). Images were taken using a 40x lens of an Olympus FV100 SW laser confocal microscope, and they were processed using the FV10 ASW software version 4.1. The GFP fluorescence was captured with 488/507 nm wavelengths of excitation/emission, respectively. For the histological analysis, the sections were dyed with toluidine blue. Images were taken of transversal sections and of the midsections of leaves with systemic infections using the 6.5x lens of a Nikon E200 microscope. The leaf's thickness was measured and the number of cells per mm<sup>2</sup> was counted in four plants with moderate to severe symptoms at 15dpi. The number of cells and the thickness of the leaf blade were graphed using 12 individual values. We tested the null hypothesis that the means of plants with severe and moderate symptoms are equal to healthy plants. F tests were performed on two samples to determine the homogeneity of variances. The statistical significance between the pairs of means (severe or moderate symptoms vs healthy plants) was obtained using the Student's t-test on two samples, assuming unequal variances, using Excel's Data Analysis ToolPak program. For the gene expression studies, leaves with systemic infections were taken from three plants, frozen, and ground together in liquid

**Cuadro 1. Plásmidos usados por tratamiento**  
**Table 1. Plasmids used per treatment**

| Tratamiento/treatment            | Plásmidos/plasmids                           | Ensayo/Assay    |                 |
|----------------------------------|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                  |                                              | <sup>x</sup> TT | <sup>y</sup> SH |
| Testigo/control                  | pBluescript II SK+                           | +               | +               |
| Virus silvestre/ Wild type virus | pEuMV-YP:HA + pEuMV-YP:HB                    | +               | -               |
| Vector GFP / GFP vector          | pEuMV-YPDAV1:GFP                             | +               | -               |
| EuMV-YP GFP                      | pEuMV-YPDAV1:GFP + pEuMV-YP:HB               | +               | -               |
| EuMV-YP + EuMV-YP GFP            | pEuMV-YP:HA + pEuMV-YP:HB + pEuMV-YPDAV1:GFP | +               | -               |

<sup>x</sup>T=Localización en tejidos, <sup>y</sup>SH=Síntomas e Histología / <sup>x</sup>TT = Tissue Tropism. <sup>y</sup>SH=Symptoms and Histology

el espesor de la lámina foliar a partir de 12 valores individuales. Se probó la hipótesis nula de que las medias de las plantas con síntomas severos y moderados son iguales a las plantas sanas. Se llevaron a cabo pruebas F de dos muestras para determinar la homogeneidad de varianzas. La significancia estadística de la diferencia entre pares de medias (síntomas severos o moderados contra plantas sanas) se obtuvo con la prueba t de Student de dos muestras suponiendo varianzas desiguales, utilizando el programa Data Analysis ToolPak de Excel. Para los estudios de expresión génica, se tomaron hojas con infección sistémica de tres plantas, se congelaron y se molieron juntas en nitrógeno líquido. Se extrajo RNA total con el estuche RNeasy Plant mini kit (Qiagen) y un tratamiento con DNasa I. La primera cadena de cDNA se sintetizó con 500 ng de RNA total, Oligo-dT [d (T) 23VN] y el estuche ProtoScript M-MuLV, siguiendo el protocolo del fabricante (New England Biolabs, EE. UU.), el volumen final se ajustó a 50 µL. Para la segunda cadena, se utilizaron 0.2 µM de los cebadores para los genes *cycA1*, *cycA2*, *cdkB2.2* (Caracuel *et al.*, 2012) y *ubi3* (Kotakis *et al.*, 2010), 5 µL del cDNA, 0.2 mM dNTPs, 1.25 unidades de Taq polimerasa y amortiguador Thermo Pol (New England Biolabs) en 25 µL, con el programa: 94 °C por 5 min / 28 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 1 min / 72 °C por 10 min. Se separaron 10 µL en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. GFP se detectó en forma directa en todos los tipos de células del mesófilo, como la epidermis superior y el parénquima en empalizada (Figura 1A), el parénquima esponjoso y la epidermis inferior (Figura 1C) de las hojas con infección sistémica a los 15 ddi. No se detectó GFP en plantas sanas (Figura 1B y 1D). La fluorescencia de GFP fue baja y no fue posible detectarla en forma directa en el floema de la nervadura media y en otras células de los haces vasculares, pero si mediante inmunodetección



**Figura 1.** Localización de EuMV-YP en *N. benthamiana*. Plantas inoculadas con el virus silvestre + EuMV-YP GFP a los 15 ddi (A, C) y plantas sanas (B, D). Parénquima en empalizada (A, B) y esponjoso (C, D). Barras: 5 µm

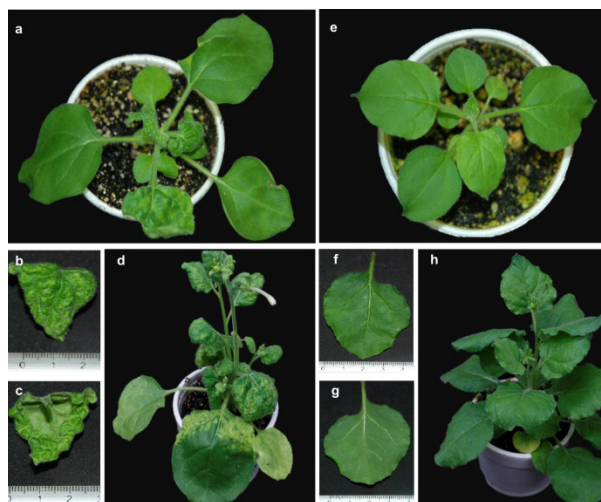
**Figure 1.** Tissue tropism of EuMV-YP in *N. benthamiana*. Plants inoculated with the wild virus + EuMV-YP GFP at 15 ddi (A, C) and healthy plants (B, D). Palisade (A, B) and spongy parenchyma (C, D). Bars: 5 µm.

nitrogen. Total RNA was extracted with the RNeasy Plant mini kit (Qiagen) and a treatment with DNase I. The first cDNA strand was synthesized with 500 ng



(datos no mostrados). Estos resultados demuestran que EuMV-YP es capaz de invadir todos los tipos de células del mesófilo en *N. benthamiana* en una alta proporción, tal como lo hacen ACMV y TGMV (Wage *et al.*, 2001). EuMV-YP también causó síntomas severos en *N. benthamiana*; a los 15 ddi se encontraron plantas con distintos grados de severidad: siete leves, ocho moderados y cinco severos. Las hojas con infección sistémica de plantas con síntomas severos presentaron enrollamientos pronunciados del margen hacia el envés, así como arrugamientos o abultamientos abundantes (Figura 2A, 2B y 2C), estos síntomas se mantuvieron hasta los 21 ddi. A los 25 ddi aparecieron mosaicos cloróticos y a los 28 ddi se observó la atenuación de síntomas (Figura 2D), que permanecieron así hasta la finalización del experimento. Estos resultados demuestran que al igual que ACMV y TGMV, EuMV-YP es capaz de inducir síntomas severos en *N. benthamiana*. Se han descrito tres determinantes genéticos que confieren la localización tisular de TGMV (Morra y Petty, 2000). EuMV-YP pertenece a un clado taxonómico distinto (Hernández *et al.*, 2007), por tanto, los determinantes genéticos que le confieren la capacidad de invadir el mesófilo y de producir síntomas severos pueden ser distintos. Los abultamientos observados en las hojas de las plantas con síntomas severos sugerían que EuMV-YP causaba alteraciones anatómicas en las hojas (Figura 2A), además de una alta frecuencia de eventos de división celular (Figura 1A). Para caracterizar este hallazgo, se hizo un análisis histológico exhaustivo de las hojas en regiones discretas a lo largo de toda la lámina foliar (Figura 3A). En las plantas sanas se observó la organización tisular típica de *N. benthamiana*; epidermis superior, inferior y el parénquima en empalizada de una sola capa de células, éste último con células alargadas anticlinales; el parénquima esponjoso con dos o tres capas de células esféricas (Figura 1A). En plantas infectadas se

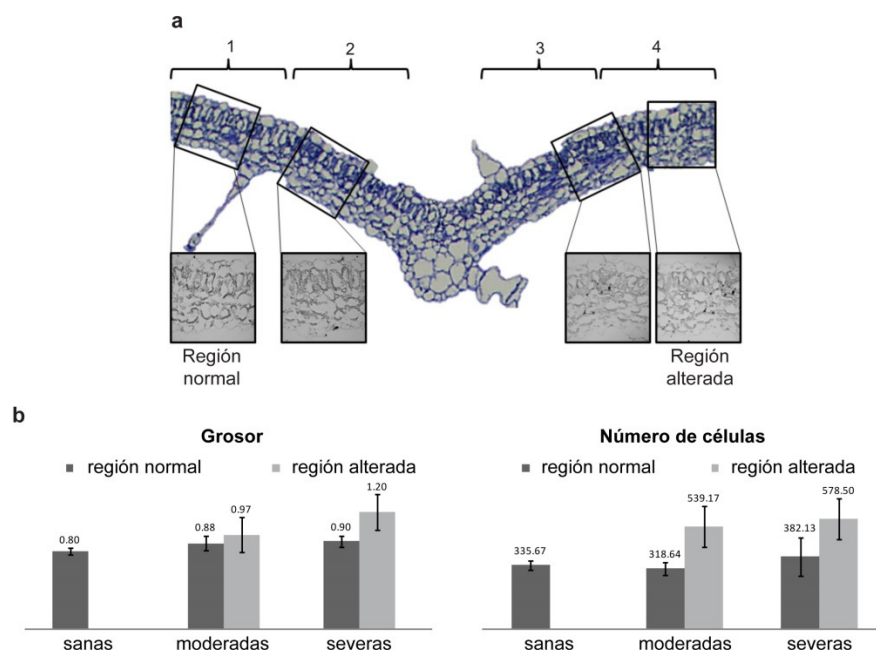
of total RNA, Oligo-dT [d (T) 23VN] and the ProtoScript M-MuLV kit, following the manufacturer protocol (New England Biolabs, U.S.A.), and the final volume was adjusted to 50  $\mu$ L. For the second strand, 0.2  $\mu$ M of specific primers were used for genes *cycA1*, *cycA2*, *cdkB2.2* (Caracuel *et al.*, 2012) and *ubi3* (Kotakis *et al.*, 2010), 5  $\mu$ L of the cDNA, 0.2 mM dNTPs, 1.25 units of Taq polymerase and Thermo Pol buffer (New England Biolabs) in 25  $\mu$ L, with the program: 94 °C for 5 min / 28 cycles at 94 °C for 30 s, 56 °C for 60 s and 72 °C for 1 min / 72 °C for 10 min. We separated 10  $\mu$ L in an agarose gel at 0.8% stained with ethidium bromide. GFP was found directly in all types of mesophyll cells, such as the upper epidermis and the parenchyma in palisade (Figure 1A), the spongy parenchyma and the lower epidermis (Figure 1C) of the leaves with systemic infections 15 dpi. No GFP was found in healthy plants (Figure 1B and 1C). GFP fluorescence was low and was not directly detectable in the phloem of the midrib and in other cells of the vascular bundles, although it was found using immunodetection (data not shown). These results show that EuMV-YP is capable of invading all types of mesophyll cells in *N. benthamiana* in a high proportion, just as ACMV and TGMV (Wage *et al.*, 2001). EuMV-YP also caused severe symptoms in *N. benthamiana*; at 15 dpi, plants were found with different degrees of severity: seven mild, eight moderate and five severe. The leaves with systemic infections from plants with severe symptoms presented strong downward curling of the margins, as well as abundant crinkling or bulging (Figure 2A, 2B and 2C); these symptoms remained until 21 dpi. At 25 dpi, chlorotic mosaics appeared and at 28 dpi, the symptoms became attenuated (Figure 2D), and remained mitigated until the end of the experiment. These results show that, like ACMV and TGMV, EuMV-YP is capable



**Figura 2.** Síntomas severos producidos por EuMV-YP. EuMV-YP (A-D) y plantas sanas (E-H), a los 15 (A-C, E-G) y 28 ddi (D y H). Vistas dorsal (B y F) y ventral (C y G).

**Figure 2.** Severe symptoms produced by EuMV-YP. EuMV-YP (A-D) and healthy plants (E-H), at 15 (A-C, E-G) and 28 dpi (D and H). Dorsal (B and F) and ventral (C and G) views.

of inducing severe symptoms in *N. benthamiana*. Three genetic determinants have been described that confer the tissue tropism of TGMV (Morra and Petty, 2000). EuMV-YP belongs to a different taxonomic clade (Hernández *et al.*, 2007), and therefore the genetic determinants that give it the capability of invading the mesophyll and of producing severe symptoms can be different. The bulges observed in the leaves of plants with severe symptoms suggested that EuMV-YP caused anatomic alterations in the leaves (Figure 2A), as well as a high frequency of cell division events (Figure 1A). To characterize this finding, a thorough histological analysis was carried out on the leaves in discreet regions throughout the entire leaf blade (Figure 3A). In healthy plants, a typical *N. benthamiana* tissue organization was observed; upper and lower epidermis and the palisade

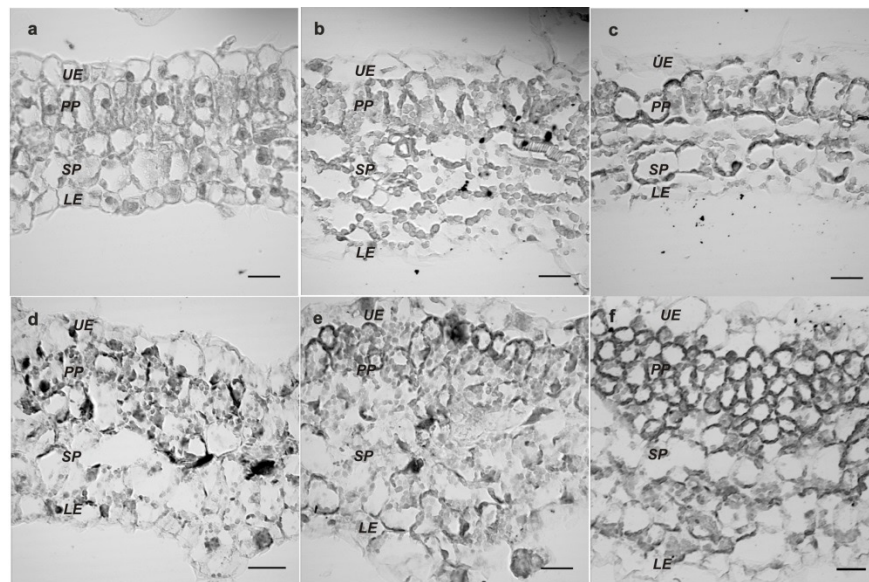


**Figura 3.** Análisis cuantitativo del efecto de EuMV-YP. Sección transversal de una hoja (A). Gráficas de grosor de la lámina foliar y del número de células (B) en plantas con síntomas moderados, severos o sanas. Se incluyen barras de error de desviación estándar.

**Figure 3.** Quantitative analysis of the effect of EuMV-YP. Cross section of a leaf (A). Graphs of the thickness of the leaf blade and number of cells (B) in plants with moderate or severe symptoms, or healthy plants. Includes standard deviation error bars.

observaron regiones con cambios en la morfología de las células y regiones engrosadas (Figura 4B, D, E y F), representando el 20 y el 50% de la hoja de las plantas con síntomas moderados y severos, respectivamente. El valor medio de las regiones engrosadas (alteradas) en plantas que mostraron síntomas severos fue significativamente diferente al de las regiones sin cambios (normales) en pruebas de t student ( $t \leq 7.55$ ,  $P \ll 0.01$ ); lo mismo ocurrió en regiones alteradas vs normales de plantas con síntomas moderados ( $t \leq 2.71$ ,  $P \leq 0.02$ ) (Figura 3B Izq.). El número de células fue significativamente mayor en las plantas con síntomas severos o moderados en comparación con el de las sanas ( $t \leq 6.18$ ,  $P < 0.01$ ,  $t < 3.87$ ,  $P \leq 0.01$ , respectivamente), con incrementos de 50 y 100% de las plantas con síntomas moderados y severos, respectivamente (Figura 3B Der.). La proliferación celular se observó en el parénquima en empalizada y esponjoso (Figura 4),

parenchyma of one single layer of cells, the latter with elongated anticlinal cells; the spongy parenchyma with two or three layers of spherical cells (Figure 4F). In infected plants, areas were noticed with changes in the morphology of cells and thickened regions (Figure 4B, D, E and F), accounting for 10 and 50% of the leaf in plants with moderate and severe symptoms, respectively. The average value of the thickened regions (altered) in plants that displayed severe symptoms was significantly different to that of the regions without changes (normal) in Student's t tests ( $t \leq 7.55$ ,  $P \ll 0.01$ ); the same happened in regions vs normal regions of plants with moderate symptoms ( $t \leq 2.71$ ,  $P \leq 0.02$ ) (Figure 3B Left). The number of cells was significantly higher in plants with severe or moderate symptoms in comparison with those in healthy plants ( $t \leq 6.18$ ,  $P < 0.01$ ,  $t < 3.87$ ,  $P \leq 0.01$ , respectively), with increases of 50 and 100% of the



**Figura 4.** Cambios anatómicos inducidos por EuMV-YP. Plantas sanas (A) o con síntomas severos (B-F). Cambios de morfología celular en parénquima esponjoso (SP) y en empalizada (PP) (B-C). Epidermis superior (UE) e inferior (LE). Aumento de 680x. Barras: 20  $\mu$ m.

**Figure 4.** Anatomical changes induced by EuMV-YP. Healthy plants (A) or with severe symptoms (B-F). Changes in cell morphology in spongy (SP) and in palisade parenchyma (PP) (B-C). Upper (UE) and lower (LE) epidermis. 680x scale. Bars: 20  $\mu$ m.

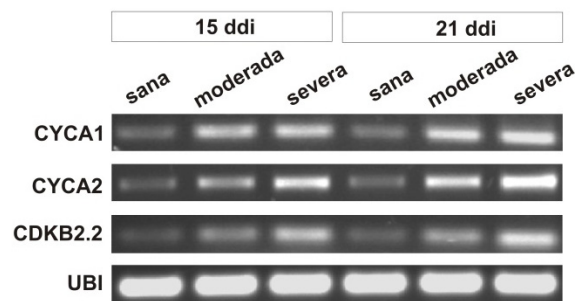
que comúnmente tenían cuatro capas de células (Figura 4E y 4F). Sin embargo, en las plantas con los síntomas más severos, se encontraron hasta 10 capas (datos no mostrados). Ciertas regiones de las hojas presentaban alteración de la morfología celular, particularmente del parénquima en empalizada y esponjoso (Figura 4B y 4B). Además, se observaron células esféricas y de tamaño reducido en las regiones con mayor proliferación celular (Figura 4F). Estos resultados confirman que los abultamientos de las hojas son producto de la inducción de la división celular en el mesófilo de *N. benthamiana*. Resultados similares se encontraron al expresar la proteína C12 del *Chrysanthemum virus B* (CVB) en las hojas de *N. tabacum*, la cual es un determinante de patogenicidad y virulencia. CVB provoca enrollamientos y proliferación celular en las hojas del crisantemo, su hospedero natural (Lukhovitskaya *et al.*, 2014). De hecho, muchos virus producen síntomas similares, pero no se han realizado los estudios histológicos que revelen la naturaleza de los síntomas, he aquí la relevancia del presente estudio. Cabe destacar que EuMV-YP es el primer ejemplo de un geminivirus que puede inducir la división celular en el parénquima en empalizada y esponjoso, por tanto, resulta un modelo interesante para estudiar los determinantes genéticos que están induciendo este fenómeno. Por el contrario, existen múltiples reportes de la inducción de la división celular en las células del floema y células asociadas en las nervaduras de las hojas. Tal es el caso de los Curtovirus y los begomovirus monopartitas, entre los geminivirus (Park *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2017) y de virus de RNA (Xie *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016), en todos estos casos, la proliferación celular inducida conlleva a la producción de tumores en las nervaduras de las hojas. En concordancia con los resultados anteriores, la expresión los de los genes *cycA1*, *cycA2* y *cdkB2.2* se incrementó en las hojas de plantas

plants with moderate and severe symptoms, respectively (Figure 3B Right). Cell proliferation was observed in the palisade and spongy parenchyma (Figure 4), which commonly had four layers of cells (Figure 4E and 4F). However, in plants with the most severe symptoms, up to 10 layers were found (data not shown). Certain regions of the leaves presented alterations in cell morphology, particularly of the palisade and spongy parenchyma (Figure 4B y 4B). Also, shpere-shaped and small cells were observed in the regions with the greatest cell proliferation (Figure 4F). These results confirm that the bulges in the leaves are a product of the induction of cell division in the *N. benthamiana* mesophyll. Similar results were found when expressing protein C12 of the *Chrysanthemum virus B* (CVB) in *N. tabacum* leaves, which is a determinant of pathogenicity and virulence. CVB causes curling and cell proliferation in the leaves of chrysanthemum, its natural host (Lukhovitskaya *et al.*, 2014). In fact, many viruses produce similar symptoms, though no histological studies have been carried out to reveal the nature of the symptoms, and hence the relevance of this study. It is worth pointing out that EuMV-YP is the first example of a geminivirus that can induce cell division in the palisade and spongy parenchyma, and is therefore an interesting model to study the gene determinants that are inducing this phenomenon. On the other hand, there are several reports on the induction of cell division in the phloem and phloem-associated cells in the leaf midribs. Such is the case of Curtoviruses and the monopartite begomoviruses, amongst the geminiviruses (Park *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2017) and RNA viruses (Xie *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016); in all these cases, the induced cell proliferation leads to the production of tumors in the leafmidribs. In consistency with the previous results, the expression of genes *cycA1*, *cycA2* and



infectadas a los 15 y 21 ddi en comparación con la de plantas sanas (Figura 5), mientras que el gen *ubi3* se mantuvo sin cambio. La regulación positiva de genes que participan en la entrada a la fase mitótica (Breyne *et al.*, 2002) es congruente con los incrementos del número de células en plantas con síntomas moderados o severos. Resultados similares se observaron en plantas infectadas con BCVT (Park *et al.*, 2004), CBV (Lukhovitskaya *et al.*, 2014) y el *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV; Shen *et al.*, 2016). Por el contrario, los begomovirus bipartitas *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) y TGMV, activan la entrada al endociclo en *Arabidopsis thaliana* y en *N. benthamiana*, respectivamente (Nagar *et al.*, 2002; Ascencio *et al.*, 2008). CaLCuV activa la expresión de la mayoría de los genes que participan en la entrada al ciclo celular en la fase de síntesis de ADN y reprime la expresión de la mayoría de los genes asociados con la fase M o de división celular como CDKB2 en *A. thaliana* (Ascencio *et al.*, 2008), lo que explica que CaLCuV induzca la endoreduplicación y no la división celular. Los aislados EuMV-Jal y EuMV-YP, que producen síntomas similares en varios hospederos experimentales y son incompatibles en replicación, han adquirido secuencias únicas en sus regiones intergénicas que los distinguen de virus filogenéticamente relacionados (Gregorio *et al.*, 2010). EuMV-YP puede haber perdido las secuencias necesarias para bloquear el punto de control G2 / M o puede haber adquirido determinantes genéticos para inducir un ciclo mitótico completo, mediante mutación o la incorporación de secuencias genómicas de otros virus. Esto queda por determinarse. En conclusión, EuMV-YP es capaz de producir síntomas severos en *N. benthamiana* y de llegar al mesófilo, donde induce la mitosis y cambios en la morfología celular, así como la expresión de genes relacionados con la división celular.

*cdk2.2* increased in the leaves of infected plants at 15 and 21 dpi in comparison with those for healthy plants (Figure 5), while gene *ubi3* remained unchanged. The positive regulation of genes that participate in the entry into the mitotic phase (M) (Breyne *et al.*, 2002) is consistent with the cell increases in number found in plants with moderate or severe symptoms. Similar results were observed in plants infected with BCVT (Park *et al.*, 2004), CBV (Lukhovitskaya *et al.*, 2014) and the *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV; Shen *et al.*, 2016). On the other hand, the bipartite begomoviruses *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) and TGMV, activate the entry to the endocycle in *Arabidopsis thaliana* and in *N. benthamiana*, respectively (Nagar *et al.*, 2002; Ascencio *et al.*, 2008). CaLCuV activates the expression of most of the genes that participate in the entry to the cell cycle in the phase of DNA synthesis and suppresses the expression of most genes associated to M phase or cell division such as CDKB2 in *A. thaliana*



**Figura 5.** EuMV-YP induce la expresión de genes relacionados con la mitosis. RT-PCR de genes *cycA1*, *cycA2*, *cdk2.2* a los 15 y 21 ddi en plantas sanas, con síntomas moderados y severos. El gen *ubi3* permanece sin cambio.

**Figure 5.** EuMV-YP induces the expression of genes related to mitosis. RT-PCR of genes *cycA1*, *cycA2*, *cdk2.2* at 15 and 21 dpi in healthy plants or with moderate and severe symptoms. Gene *ubi3* remains unchanged.



## AGRADECIMIENTOS

A Oscar Moreno y Hernán Villanueva por los hemidímeros y el vector VIGS; a Jorge Ramírez Prado por apoyo con los análisis estadísticos. Al CONACYT por el financiamiento otorgado al proyecto #98920 a LL0 y por la beca de doctorado #46688 a NGT

## LITERATURA CITADA

- Ascencio IJT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R and Hanley BL. 2008. Global analysis of arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology* 148:436-454. DOI: 10.1104/pp.108.121038
- Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, and Zabeau M. 2002. Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:14825-14830. <https://doi.org/10.1073/pnas.222561199>
- Caracuel Z, Lozano DR, Huguet S, Arroyo MM, Rodríguez NEA and Bejarano ER. 2012. C2 from beet curly top virus promotes a cell environment suitable for efficient replication of geminiviruses, providing a novel mechanism of viral synergism. *New Phytologist* 194:846-858. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04080.x
- Gregorio JJ, Bernal AA, Bañuelos HB, Alpuche SAG, Hernández ZC, Moreno VO, Frías TG, Argüello AG. 2010. Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal* 7:275. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-275>
- Hanley BL, Bejarano ER, Robertson D and Mansoor S. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology* 11:777-788. DOI: 10.1038/nrmicro3117
- Hernández ZC, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno VO. 2007. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology* 56:763-770. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01652.x
- Kotakis C, Vrettos N, Kotsis D, Tsagris M, Kotzabasis K y Kallantidis K. 2010. Light intensity affects RNA silencing of a transgene in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC Plant Biology* 10:220. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-220>
- Latham JR, Saunders K, Pinner MS and Stanley J. 1997. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *The Plant Journal* 11:1273-1283. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061273.x
- Lukhovitskaya NI, Solovieva AD, Boddeti SK, Thaduri S, Solov'yev AG and Savenkov EI. 2013. An RNA virus-

(Ascencio *et al.*, 2008), which explains CaLCuV inducing endoreduplication and not cell division. EuMV-Jal and EuMV-YP isolates, which produce similar symptoms in several experimental hosts and are incompatible in replication, have acquired unique sequences in their intergenic regions that set them apart from phylogenetically related viruses (Gregorio *et al.*, 2010). EuMV-YP may have lost the sequences needed to block the G2/M checkpoint or it may have acquired gene determinants to induce a complete mitotic cycle, whether by mutation or the incorporation of genomic sequences from other viruses. This is yet to be determined. In conclusion, EuMV-YP is capable of producing severe symptoms in *N. benthamiana* and of reaching the mesophyll, where it induces mitosis and changes in cell morphology, as well as the expression of genes related to cell division.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Oscar Moreno and Hernán Villanueva for the hemidimers and the VIGS vector; to Jorge Ramírez Prado for his support with the statistical analyses. To CONACYT for the funds given to project #98920 to LL0 and for the PhD scholarship #46688 to NGT.

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

- encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco species. *The Plant Cell* 25:960-973. DOI: 10.1105/tpc.112.106476
- Morra MR and Petty IT. 2000. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *The Plant Cell* 12: 2259-2270. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2259>
- Moo LRC, González AK, Rodríguez LC, Suarez V, Castaño E. 2012. Expression of RNA polymerase IV and V in *Oryza sativa*. *Electronic Journal of Biotechnology* 15:9-9. DOI: 10.2225/vol15-issue2-fulltext-8
- Nagar S, Hanley BL and Robertson D. 2002. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *The Plant Cell* 14:2995-3007. <http://doi.org/10.1105/tpc.005777>

- Park J, Hwang H, Shim H, Im K, Auh CK, Lee S and Davis KR. 2004. Altered cell shapes, hyperplasia, and secondary growth in *Arabidopsis* caused by beet curly top geminivirus infection. *Molecules and Cells* 17:117-124. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055537>
- Shen J, Chen X, Chen J and Sun L. 2016. A phloem-limited fijivirus induces the formation of neoplastic phloem tissues that house virus multiplication in the host plant. *Scientific Reports* 6:29848. <http://doi.org/10.1038/srep29848>
- Srivastava A, Agrawal L, Raj R, Jaidi M, Raj SK, Gupta S, Dixit R, Singh PC, Tripathi T, Sidhu OP, Singh BN, Shukla S, Chauhan PS and Kumar S. 2017. Ageratum enation virus Infection Induces Programmed Cell Death and Alters Metabolite Biosynthesis in *Papaver somniferum*. *Frontiers in Plant Science* 8:1172. DOI: 10.3389/fpls.2017.01172
- Villanueva AH, Us CR, López OL, Robertson D, Guerra PO, Minero GY and Moreno VO. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters* 35:811-823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>
- Wege C, Saunders, K, Stanley J and Jeske H. 2001. Comparative analysis of tissue tropism of bipartite geminiviruses. *Journal of Phytopathology* 149:359-368. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2001.00640.x
- Xie L, Lv MF, Zhang HM, Yang J, Li JM, Chen JP. 2014. Tumours induced by a plant virus are derived from vascular tissue and have multiple intercellular gateways that facilitate virus movement. *Journal of Experimental Botany* 65:4873-4886. DOI: 10.1093/jxb/eru254

Phytophthora capsici and *P. drechsleri* mating types A1 and A2 coexist in ornamental nursery plants

Tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* coexisten en plantas ornamentales de vivero

Alejandro Soto-Plancarte, Sylvia Patricia Fernández-Pavía*, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Luis López-Pérez, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, CP. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México; Yolanda Leticia Fernández-Pavía, Programa de Fruticultura, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México; Martha Elena Pedraza-Santos, Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas esquina Berlín, Colonia Viveros, CP. 60090, Uruapan, Michoacán, México; Juan Emilio Álvarez-Vargas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, CP. 62209, Cuernavaca, Morelos, México. *Autor para correspondencia: fernandezpavia@hotmail.com.

Recibido: 19 de Diciembre, 2017.

Aceptado: 02 de Marzo, 2018.

Soto-Plancarte A, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, López-Pérez L, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, Álvarez-Vargas JE. 2018. *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* mating types A1 and A2 coexist in ornamental nursery plants. *Revista Mexicana de Fito-patología* 36(2): 298-307.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-5

Primera publicación DOI: 11 de Abril, 2018.

First DOI publication: April 11, 2018.

Resumen. No se ha reportado la presencia de ambos tipos de compatibilidad de especies de *Phytophthora* en plantas hospedantes sembradas en una misma maceta en viveros comerciales de México. En 2015, se colectaron aislados de *Phytophthora* en viveros comerciales en la Ciudad de México y en el estado de Morelos. Se detectaron los tipos de

Abstract. The presence of both mating types of *Phytophthora* species in the same pot has not been reported in hosts of commercial nurseries in Mexico. Isolates of *Phytophthora* were collected in commercial nurseries of Mexico City and Morelos state during 2015. Mating types A1 and A2 of *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* were detected on wilted plants of *Capsicum annuum* (stems) and *Petunia x hybrida* (rhizosphere), respectively. *Phytophthora* isolates coinoculated in planta formed oospores under greenhouse conditions. *Phytophthora* was reisolated from inoculated plants, and identified with morphological and molecular tools. Mating types A1 and A2 of *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* occur simultaneously within nursery plants, this suggests that sexual recombination and genetic variation is occurring. Mating types A1 and A2 of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora dechsleri* were detected

compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* en plantas marchitas de *Capsicum annuum* (tallos) y *Petunia x hybrida* (rizósfera), respectivamente. Los aislados de *Phytophthora* co-inoculados *in planta* formaron oosporas en condiciones de invernadero. *Phytophthora* fue re-aislada de plantas inoculadas e identificada mediante herramientas morfológicas y moleculares. Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* se presentan simultáneamente en plantas de invernadero, lo cual sugiere que están ocurriendo recombinación sexual y variación genética. Los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora drechsleri* fueron detectados por primera vez en *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida* respectivamente, en viveros mexicanos.

Palabras clave: Oomicetes, oosporas, *Petunia*, *Capsicum annuum*.

La planta ornamental *Petunia x hybrida*, así como plantas de chile para huertos familiares, se producen en el estado de Morelos y en la Ciudad de México, dos de las más importantes entidades productoras de plantas ornamentales de invernadero en México (Mundo-Ocampo, 2006). Sin embargo, su producción es afectada por enfermedades que afectan a la raíz, causadas por varias especies de *Phytophthora*. *P. capsici* es un patógeno muy destructivo con un rango de plantas hospedantes de más de 50 especies vegetales a nivel mundial, entre ellas, solanáceas, cucurbitáceas, fabáceas y plantas ornamentales (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha reportado que *P. drechsleri* afecta a más de 25 especies de plantas hortícolas y ornamentales (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2012). En México, uno de los

for the first time in *Capsicum annuum* and *Petunia x hybrid* respectively, in Mexican nurseries.

Key words: Oomycetes, Oospores, *Petunia*, *Capsicum annuum*.

The ornamental plant *Petunia x hybrid* and chili pepper plants for home gardens are produced in Morelos state and Mexico City, two of the most important locations that grow ornamental nursery flower pot plants in Mexico (Mundo-Ocampo, 2006). Nevertheless, production is limited by root diseases caused by various *Phytophthora* species. *P. capsici* is a highly destructive pathogen with a host range of over 50 plant species including Solanaceous, Cucurbitaceous, Fabaceous and ornamental plants around the world (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013), on the other hand *P. drechsleri*, has been reported affecting over 25 horticultural and ornamental plant species (Lamour *et al.*, 2012; Fernández-Pavía *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2012). In Mexico, one of the most important root pathogens is *Phytophthora capsici*, which is a highly destructive pathogen of chili pepper plants. These *Phytophthora* species are heterothallic, requiring the presence of opposite mating types (A1 and A2) for oospore formation. The occurrence of mating types of *P. capsici* and *P. drechsleri* in the same nursery on different hosts has been detected in previous studies conducted in our laboratory in Mexico (data not published). However, the presence of both mating types of these species in the same host in ornamental nurseries has not been documented. The objective of this study was to determine if both, A1 and A2, mating types of *Phytophthora* species can be present in the same host, and if oospores are formed *in planta* under greenhouse controlled conditions.

más importantes patógenos que afectan la raíz es *Phytophthora capsici*, y es sumamente destructivo en plantas de chile. Estas especies de *Phytophthora* son heterotálicas y requieren la presencia de tipos de compatibilidad opuestos (A1 y A2) para formar oosporas. La presencia de los tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* en diferentes plantas hospedantes en un mismo vivero ha sido detectada en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio en México (datos no publicados). Sin embargo, no se ha documentado la presencia de ambos tipos de compatibilidad de esas especies en una misma planta hospedera en viveros de plantas ornamentales. El objetivo del presente estudio fue determinar si ambos tipos de compatibilidad (A1 y A2) de especies de *Phytophthora* pueden estar presentes en la misma planta hospedante, y si las oosporas se forman *in planta* bajo condiciones controladas de invernadero.

Los aislados de *Phytophthora* se obtuvieron de viveros comerciales de plantas de *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida* con síntomas de marchitamiento en Morelos y en la Ciudad de México en 2015. Para aislar el patógeno se analizó tejido vegetal de *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida* colectado de la rizósfera de plantas infectadas que mostraban síntomas de marchitez y pudrición de raíz. Los tejidos vegetales fueron enjuagados con agua corriente; se cortaron pequeños fragmentos infectados, se sembraron en un medio de cultivo NARPH-V8 (Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50% natamicina, 50% lactosa)], ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), PCNB (0.10 g L⁻¹) e himexazol (0.075 g L⁻¹), y se incubaron a 25 °C en oscuridad. Muestras de suelo de la rizósfera fueron sometidas a la utilización de hojas de *Rhododendron* sp. como cebo. Brevemente, se pusieron a flote seis hojas de *Rhododendron* sobre suelo completamente inundado (10 g de suelo:20 mL de agua estéril) e incubadas por 48 h a 25 °C; se eliminó el

Phytophthora isolates were obtained from commercial nursery plants of *Capsicum annuum* and *Petunia x hybrid* with wilting symptoms in Morelos and Mexico City, Mexico, during 2015. Plant tissue of *Capsicum annuum* and *Petunia x hybrid* soil of the rhizosphere from diseased plants with wilt and root rot symptoms were analyzed for pathogen isolation. Plant tissues were rinsed with running water, small diseased tissue fragments were cut, plated out onto NARPH-V8 medium (Delvocid Instant (0.02 g L⁻¹) [(50% natamycin, 50% lactose)], Ampicillin (0.27 g L⁻¹), Rifampicin (0.01 g L⁻¹), PCNB (0.10 g L⁻¹), and Hymexazol (0.075 g L⁻¹) and incubated at 25 °C in the dark. Soil samples of the rhizosphere were subjected to *Rhododendron* sp. leaves baiting. Briefly, six *Rhododendron* leaves were floated over flooded soil (10 g of soil:20 mL of sterile water) and incubated for 48 h at 25 °C, the petiole was removed, disinfested with 10% commercial bleach (0.6% sodium hypochlorite) for 30 sec, rinsed with sterile distilled water twice, blotted dry with sterile paper towels, transferred to NARPH-V8 plates, and incubated as above. *Phytophthora* isolates were identified by examination under a microscope and transferred to corn meal agar media (CMA, 17 g L⁻¹) to obtain pure cultures by the hyphal tip method. Sporangia were produced and morphologically characterized by incubating V8 agar blocks plus mycelia, in sterile distilled water at 25 °C under continuous fluorescent light for three to five days. Mating type of the *Phytophthora* isolates was determined by pairing them with known A1 and A2 strains of *P. capsici* and *P. cinnamomi* on V8 agar at 25 °C in the dark and examined after 20 days. Additionally, opposite mating types of the *Phytophthora capsici* (A1 and A2) and *P. drechsleri* (A1 and A2) isolates were paired out. Pairing of opposite mating types *in planta* was carried out by inoculating *Phytophthora*

peciolo, se desinfectó con cloro comercial al 10% (0.6% hipoclorito de sodio) por 30 seg, se enjuagó dos veces con agua destilada estéril, se secó con toallas de papel estériles, se transfirió a cajas que contenían NARPH-V8 y se incubó como se indicó anteriormente. Los aislados de *Phytophthora* fueron identificados bajo el microscopio y, a continuación, se transfirieron a medio de cultivo harina de maíz agar (CMA, 17 g L⁻¹), con la finalidad de obtener cultivos puros utilizando el método de punta de hifa. Se produjeron esporangios que fueron caracterizados morfológicamente incubando bloques de agar V8 con micelio en agua destilada estéril a 25 °C bajo luz fluorescente continua de tres a cinco días. El tipo de compatibilidad de los aislados de *Phytophthora* se determinó apareándolos con cepas conocidas, A1 y A2 de *P. capsici* y *P. cinnamomi* en agar V8 a 25 °C en oscuridad y examinándolos 20 días después. También se aparearon los tipos de compatibilidad opuestos de los aislados de *Phytophthora capsici* (A1 y A2) y de *P. drechsleri* (A1 y A2). El apareamiento de los tipos de compatibilidad opuestos *in planta* se llevó a cabo mediante la inoculación de aislados de *Phytophthora* en plantas sanas de *Capsicum annuum* y *Petunia x hybrida*. El inóculo consistió en discos de 6 mm con agar V8 con micelio y esporangios. Uno de los discos que contenía el aislado A2 de *Phytophthora* se colocó en la base del tallo, y el segundo, que contenía el aislado A1 de *Phytophthora*, se colocó a 3 cm de distancia del primer disco. Las plantas control fueron inoculadas con discos de 6 mm que contenían agar V8 sin el patógeno. Las plantas se inundaron durante 24 h para favorecer el desarrollo de la enfermedad. Para confirmar la formación de oosporas *in planta* se observaron muestras de tejido necrótico del tallo bajo un microscopio de campo luminoso con el objetivo 40x. Los tejidos fueron lavados con cuidado en agua jabonosa, enjuagados con agua destilada estéril, aclarados durante 40 seg

isolates on healthy plants of *Capsicum annuum* and *Petunia x hybrid*. Inoculum consisted of six mm disks of V8 agar with mycelia and sporangia. One disk of a *Phytophthora* isolate A2 was placed on the base of the stem, while a second disk of a *Phytophthora* isolate A1 was placed three cm apart from the first disk. Control plants were inoculated with six mm disks of V8 agar without the pathogen. Plants were flooded for 24 h to favor disease development. Oospore formation *in planta* was confirmed by observing under a bright field microscope at 40x samples of necrotic stem tissue. Tissues were gently washed in soapy water, rinsed with distilled sterile water, clarified in boiling 96% ethanol for 40 sec, cooled down for 30 min, and repeating the ethanol clarification step for 40 sec, afterwards, the tissue was mounted on a glass slide.

Genomic DNA extraction was obtained by culturing the isolates on 2% clarified liquid V8 at 21 °C for 15 to 20 days, and the protocol by Möller *et al.*, (1992) was followed with modifications as previously described by Robideau *et al.*, (2011). At the final step, DNA pellet was resuspended in 0.1X TE buffer containing 50 µg/mL of RNase A and incubated at 65 °C for 10 min.

The ribosomal DNA ITS (internal transcribed spacer) region was amplified using primers UN-up18S42 (Bakkeren *et al.*, 2000), UN-lo28S1220 (Bala *et al.*, 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 and ITS4 (Lévesque and De Cock 2004). Partial sequences of the mitochondrial gene COI (cytochrome *c* oxidase subunit 1) were amplified with primers OomCoxIlevup and Fm85mod (Martin and Tooley, 2003), and β-tubulin with primers Oom-Btub-up415 and Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau *et al.*, 2007).

PCR amplifications were performed using the following conditions: all reactions had an initial denaturation step at 95 °C for 3 min and a final extension step at 72 °C for 8-10 min. The ITS

en etanol al 96% hirviendo, enfriados durante 30 min; el aclarado con etanol se repitió durante 40 seg y posteriormente, el tejido se colocó en un portaobjetos de vidrio.

Para extraer el ADN genómico, los aislados se cultivaron en medio líquido de V8 clarificado al 2% a 21 °C por 15 a 20 días, y se siguió el protocolo de Möller *et al.* (1992) con modificaciones previamente descritas por Robideau *et al.* (2011). En el último paso, la pastilla de ADN fue re-suspendida en una solución amortiguadora 0.1X TE a la cual se agregaron 50 µg/mL de ribonucleasa (RNasa) A, y se incubó a 65 °C por 10 min.

La región del ITS (espaciador transcrito interno) del ADN ribosómico fue amplificada utilizando los iniciadores UN-up18S42 (Bakkeren *et al.*, 2000), UN-lo28S1220 (Bala *et al.*, 2010), Oom-up18S67, UN-lo28S22 y ITS4 (Lévesque y Cock, 2004). Secuencias parciales del gen mitocondrial COI (citocromo *c* oxidasa subunidad 1) fueron amplificadas con los iniciadores OomCoxI Levup y Fm85mod (Martin y Tooley, 2003), y β-tubulina con los iniciadores Oom-Btub-up415 y Oom-Btub-lo1401 (Bilodeau *et al.*, 2007).

Las amplificaciones en PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: todas las reacciones fueron sometidas a un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min y un paso final de extensión a 72 °C de 8 a 10 min. La región ITS amplificada con los iniciadores Oom-up18S67 y UN-lo28S1220 se llevó a cabo en 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 58 °C por 45 seg, y 72 °C por 2 min. La misma región fue amplificada con los iniciadores UN-up18S42 y ITS4 en 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 68 °C por 45 seg y 72 °C por 1.5 min.

Las condiciones para amplificar el COI fueron las mismas descritas por Robideau *et al.* (2011). La amplificación del gen β-tubulina de los aislados de *P. capsici* consistió en 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Para los

region amplified with primers Oom-up18S67 and UN-lo28S1220 was performed with 35 cycles of 95 °C for 30 sec, 58 °C for 45 sec, and 72 °C for 2 min. The same region amplified with primers UN-up18S42 and ITS4 utilized 40 cycles of 95 °C for 30 sec, 68 °C for 45 sec, and 72 °C for 1.5 min.

Amplification conditions for COI were the same as those described by Robideau *et al.*, (2011). Amplification of the β-tubulin gene for *P. capsici* isolates were 40 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. For the *P. drechsleri* isolates a touch-down PCR was performed under the conditions described by Blair *et al.*, (2008), decreasing the temperature from 68 to 58 °C.

An Applied Biosciences Prism® 3130xl genetic analyzer was used to generate the DNA sequences from the amplification sequencing reactions. The sequences were assembled, edited to obtain consensus sequences, aligned with published sequences (NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), and analyzed using the Blast program (Geneious 8.1, www.geneious.com) to determine identity percentages. Sequences were submitted to GenBank.

A multi-locus phylogenetic analysis by maximum likelihood and Bayesian inference method, to confirm isolates identity with ex-type sequences was constructed in the science gateway CIPRES v. 3.3 (Miller *et al.*, 2010).

Two *P. drechsleri* isolates with opposite mating types were obtained from the rhizosphere soil of a *Petunia* x hybrid plant. Two *P. capsici* isolates with opposite mating types were obtained from stem tissues of a *C. annuum* plant. Morphological and molecular characterization and phylogenetic analysis (Figure 1) confirmed the identity of the isolates. The accession numbers of the isolates are shown in Table 1. All isolates had 99% similarity with sequences available in the database

aislados de *P. drechsleri* se utilizó la técnica PCR *touchdown* bajo las condiciones descritas por Blair *et al.* (2008), pero disminuyendo la temperatura de 68 a 58 °C.

Para generar las secuencias del ADN de las reacciones de amplificación-secuenciación se utilizó un analizador genético Applied Biosciences Prism® 3130xl. Las secuencias fueron ensambladas, editadas para obtener secuencias consenso, alineadas con las secuencias publicadas (NCBI, Centro Nacional de Información Biotecnológica, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y analizadas con el programa Blast (Geneious 8.1, www.geneious.com), a fin de determinar los porcentajes de identidad. Las secuencias fueron enviadas al Banco de Genes (GenBank).

Para confirmar la identidad de los aislados con secuencias ex-tipo, se llevó a cabo un análisis filogenético multi-locus aplicando el método de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, y se creó un perfil filogenético en el portal de ciencia de CI-PRES v. 3.3 (Miller *et al.*, 2010).

Dos aislados de *P. drechsleri* con tipos de compatibilidad opuestos se obtuvieron de suelo de la rizósfera de una planta de *Petunia x hybrida*. Dos aislados de *P. capsici* con tipos de compatibilidad opuestos se obtuvieron del tejido del tallo de una planta de *C. annuum*. La caracterización morfológica y molecular, así como el análisis filogenético (Figura 1), confirmaron la identidad de los aislados. Los números de Accesoión de los aislados se muestran en el Cuadro 1. Todos los aislados mostraron 99% de similitud con las secuencias de la base de datos Phytophthora – Q-bank (<http://www.q-bank.eu/bioloMICSSequences.aspx?file=Bacteria&file=FUNGI&file=Arthropods&file=Nematodes&file=Phytopl&file=Plants&file=Virus&file=Sequence&wsize=20>). Los aislados LEV6716 (A1) y LEV6717 (A2) de *Phytophthora capsici*, y LEV6731 (A1) y LEV6732 (A2) de *Phytophthora*

Phytophthora – Q-bank (<http://www.q-bank.eu/bioloMICSSequences.aspx?file=Bacteria&file=FUNGI&file=Arthropods&file=Nematodes&file=Phytopl&file=Plants&file=Virus&file=Sequence&wsize=20>). *Phytophthora capsici* LEV6716 (A1) and LEV6717 (A2) and *Phytophthora drechsleri* LEV6731 (A1) and LEV6731 (A2) isolates were deposited in the Agriculture and Agri-Food Canada culture Collection, Ottawa, Canada.

Capsicum annuum plants inoculated with both mating type isolates of *P. capsici* showed chlorosis, defoliation, wilting, and necrosis on the stem five days after inoculation (dai). *Petunia x* hybrid plants inoculated with A1 and A2 mating types of *P. drechsleri* showed wilt symptoms 10 dai. The isolates were reisolated from the lesions of the plants and identified by morphology confirming Koch's postulates. Control plants remained healthy. Abundant oospores were observed in the epidermis of stems of *C. annuum* and *Petunia x* hybrid inoculated plants (Figures 2 and 3), seven and 10 dai, respectively.

The presence of both mating types in isolates of *P. capsici* and *P. drechsleri*, in the same plant and rhizosphere, respectively indicates that sexual reproduction and genetic variation is occurring in nursery plants. Oospore formation could serve as primary inoculum (Lehtinen and Hannukkala, 2004), since reutilization of infested soil and pots occurs in nurseries throughout Mexico, contributing to the yearly presence of *Phytophthora* in nursery plants. Oospores can be long-term resistant structures in nurseries, allowing new host colonization and may introduce new recombinant genotypes of *Phytophthora* to new areas. Since the commercial nurseries sampled distribute plants to many states in Mexico, the dissemination of these pathogens into new agricultural, forestry and urban areas is highly probable. An additional risk factor is the broad host range of *P. capsici* and *P. drechsleri*

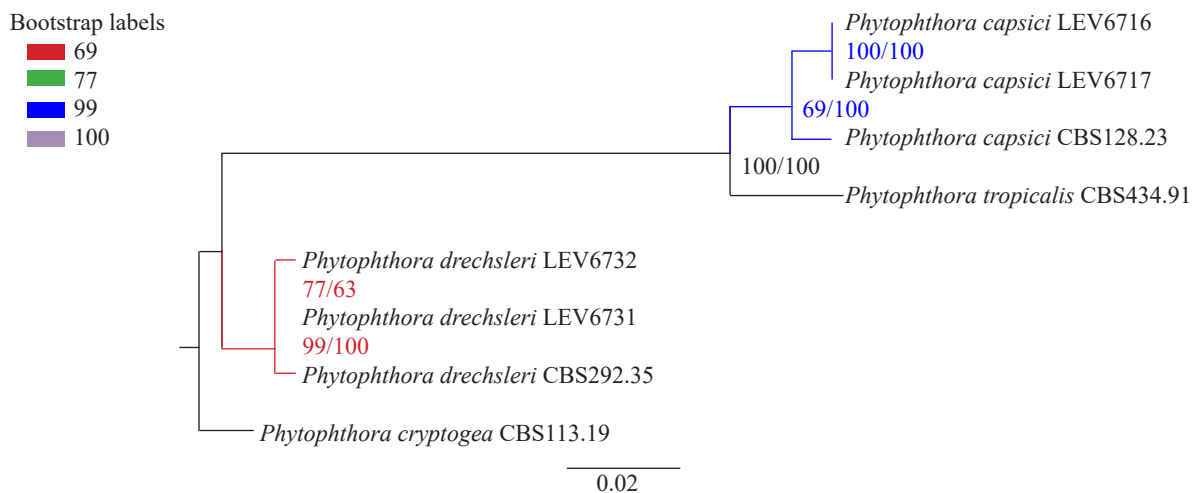


Figura 1. Análisis filogenético concatenado de los genes ITS, β -tubulina y COI utilizando máxima verosimilitud e inferencia bayesiana de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* con *Phytophthora cryptogea* como grupo externo. Los valores bootstrap de máxima verosimilitud y las probabilidades posteriores de la inferencia bayesiana en porcentajes se indican en los puntos de la rama, respectivamente. La barra de la escala indica 0.02 sustituciones por sitio por rama.

Figure 1. Phylogeny analysis derived from Maximum likelihood and Bayesian inference of concatenated ITS, β -tubulin and COI genes from *Phytophthora capsici* and *P. drechsleri* with *Phytophthora cryptogea* as an outgroup. Maximum likelihood bootstrap values and Bayesian inference posterior probabilities in percentages are indicated in the branch points, respectively. Scale bar indicates 0.02 substitutions per site per branch.

drechsleri fueron depositados en la colección del Departamento de Agricultura y Agri-Food Canadá, en Ottawa, Canadá.

Las plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con aislados de ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* mostraron clorosis, defoliación, marchitez y necrosis en el tallo cinco días después de la inoculación (ddi). Las plantas de *Petunia x hybrida* inoculadas con los tipos de compatibilidad A1 y A2

(Erwin and Ribeiro, 1996; Lamour *et al.*, 2012). Moreover, isolates with resistance to fungicides may develop and the disease will be more difficult to manage. This work showed that both mating types of *P. capsici* and *P. drechsleri* can occupy the same niche in nursery environments. Growers should improve management practices as recommended by Parke and Grünwald (2012), according to their economic resources, to reduce losses. This is the

Cuadro 1. Número de acceso de los genes ITS, b-tubulina y COI, de los aislados.
Table 1. Accession numbers of the genes ITS, b-tubulin and COI, of the isolates.

| Código aislado | Especies | Hospedante o sustrato | GenBank número de acceso | | |
|----------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|----------|
| | | | ITS | β -tubulina | COI |
| LEV6716 | <i>P. capsici</i> | <i>Capsicum annuum</i> | MH025883 | MH013476 | MH013474 |
| LEV6717 | <i>P. capsici</i> | <i>Capsicum annuum</i> | MH025884 | MH013477 | MH013475 |
| LEV6731 | <i>P. drechsleri</i> | <i>Petunia x hybrida</i> | MH025881 | MH013478 | MH013472 |
| LEV6732 | <i>P. drechsleri</i> | <i>Petunia x hybrida</i> | MH025882 | MH013479 | MH013473 |

de *P. drechsleri* mostraron síntomas de marchitez a los 10 ddi. Los aislados fueron re-aislados de las lesiones de las plantas e identificados mediante morfología para confirmar los postulados de Koch. Las plantas control permanecieron sanas. Se observaron abundantes oosporas en la epidermis de los tallos de *C. annuum* y *Petunia x hybrida* de las plantas inoculadas (Figuras 2 y 3), a los siete y 10 ddi, respectivamente.

La presencia de ambos tipos de compatibilidad en los aislados de *P. capsici* y *P. drechsleri* en la misma planta y rizósfera, respectivamente, indica que la reproducción sexual y la variación genética está ocurriendo en las plantas de vivero. La formación de oosporas podría servir como inóculo primario (Lehtinen y Hannukkala, 2004), ya que en México reutilizan el suelo y las macetas infestadas, lo cual contribuye a la presencia anual de *Phytophthora* en las plantas de vivero. Las oosporas son estructuras que resisten mucho tiempo en los viveros, lo cual permite que se vuelvan a colonizar las

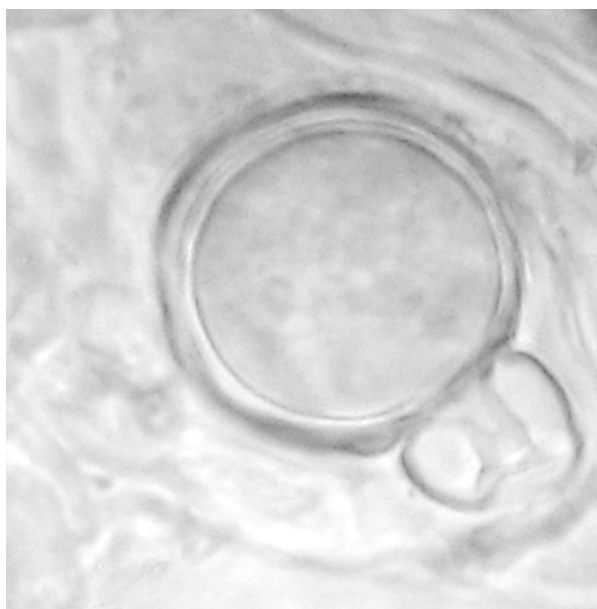


Figura 2. Oospora de *Phytophthora capsici* formada *in planta* en tejidos de la raíz de *Capsicum annuum* co-inoculados con aislados de los tipos de compatibilidad A1 y A2.

Figure 2. Oospore of *Phytophthora capsici* formed *in planta* in *Capsicum annuum* root tissues coinoculated with mating type A1 and A2 isolates.



Figura 3. Oospora de *Phytophthora drechsleri* formada *in planta* en tejidos de la raíz de *Petunia x híbrida* co-inoculados con aislados de los tipos de compatibilidad A1 y A2.

Figure 3. Oospore of *Phytophthora drechsleri* formed *in planta* in *Petunia x hybrida* root tissues coinoculated with mating type A1 and A2 isolates.

plantas hospedantes, y pueden introducir nuevos genotipos recombinantes de *Phytophthora* a zonas nuevas. Dado que los viveros comerciales muestreados distribuyen plantas a muchos estados de la República Mexicana, es muy probable que estos patógenos sean diseminados a nuevas zonas agrícolas, forestales y urbanas. Otro factor de riesgo es el amplio rango de plantas hospedantes de *P. capsici* y *P. drechsleri* (Erwin y Ribeiro, 1996; Lamour *et al.*, 2012). Además, los aislados podrían generar resistencia a los fungicidas y sería más difícil controlar la enfermedad. El presente estudio mostró que ambos tipos de compatibilidad de *P. capsici* y *P. drechsleri* pueden ocupar el mismo nicho en los ambientes de los viveros. Los productores deberían mejorar sus prácticas de manejo, como lo recomiendan Parke y Grünwald (2012), dependiendo de sus recursos económicos, a fin de reducir las pérdidas. Este es el primer reporte sobre los tipos de compatibilidad A1 y A2 de *P. capsici* y *P. drechsleri* detectados en plantas producidas en maceta en viveros comerciales en México.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a C. Andre Lévesque y Tara Rintoul del Departamento de Agricultura y a Agri-Food Canadá por su apoyo. El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que le otorgaron (no. 254151).

LITERATURA CITADA

- Bala K, Robideau GP, De'saulniers N, De Cock AWAM and Lévesque CA. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 25:22-31. <http://doi.org/10.3767/003158510X524754>
- Bakkeren G, Kronstad JW and Lévesque CA. 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia* 92:510-521. Disponible en línea: www.jstor.org/stable/3761510
- Bilodeau GJ, Lévesque CA, De Cock AWAM, Duchaine C, Brière S, Uribe P, Martin FN and Hamelin RC. 2007.

first report of mating types A1 and A2 of *P. capsici* and *P. drechsleri* detected in commercial nursery pot plants in Mexico.

Acknowledgment

We express our sincere gratitude to C. Andre Lévesque and Tara Rintoul from Agriculture and Agri-Food Canada department for their support. First author thanks to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the doctoral scholarship (no. 254151).

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

- Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. *Phytopathology* 97:632-642. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-5-0632>
- Blair JE, Coffey MD, Park SY, Geiser DM and Kang S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45:266-277. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.010>
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- Fernández-Pavía SP, Díaz-Celaya M and Rodríguez-Alvarado G. 2013. *Phytophthora* in Mexico. Pp:215-221. In: Lamour K (eds.). *Phytophthora: A global perspective*. CABI Press. Boston, MA., USA. 244p.
- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broadhost-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Lehtinen A and Hannukkala A. 2004. Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agricultural and Food Science* 13:399-410. Disponible en línea: <http://www.mtt.fi/afs/pdf/mtt-afs-v13n4p399.pdf>
- Martin FN and Tooley PW. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95:269-284. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156613>
- Miller MA, Pfeiffer W and Schwartz T. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1-8. DOI: 10.1109/GCE.2010.5676129

- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H and Geiger HH. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20:6115-6116. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334490/>
- Mundo-Ocampo J. 2006. *El vivero ornamental*. First Edition. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 461 p.
- Olson HA, Carbone I and Benson DM. 2011. Phylogenetic history of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* isolates from floriculture crops in North Carolina greenhouses. *Phytopathology* 101:1373-1384. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-10-0302>
- Parke JL and Grünwald NJ. 2012. A systems approach for management of pests and pathogens of nursery crops. *Plant Disease* 96:1236-1244. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0986-FE>
- Robideau GP, De Cock AW, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CMM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen ECP, Zhang Y, Bonants PJ, Ristaino JB and Lévesque CA. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11:1002-1011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Truong NV, Burgess L and Liew E. 2012. Cross-infectivity and genetic variation of *Phytophthora* isolates from chilli and black pepper in Vietnam. *Australasian Plant Pathology* 41:439-447. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-012-0136-4>

# Organisms associated with damage to post-harvest potato tubers

## Organismos asociados a daños en tubérculos de papa en postcosecha

Clemente de Jesús García-Ávila, Gilda Abigail Valenzuela-Tirado, José Guadalupe Florencio-Anastasio, Isabel Ruiz-Galván, Magnolia Moreno-Velázquez, Bárbara Hernández-Macías, José Abel López-Buenfil, Daniel Bravo-Pérez, José Manuel Pineda-Ríos, Andrés Quezada-Salinas\*, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Unidad Integral de Diagnóstico, Servicios y Constatación, Carretera Federal México-Pachuca Km 37.5, CP. 55740, Tecámac, Estado de México; Graciela Ávila-Quezada Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, CP. 31000, Chihuahua, México. \*Autor para correspondencia: andresqs@colpos.mx.

Recibido: 09 de Enero, 2018.

Aceptado: 16 de Abril, 2018.

García-Ávila CJ, Valenzuela-Tirado GA, Florencio-Anastasio JG, Ruiz-Galván I, Moreno-Velázquez M, Hernández-Macías B, López-Buenfil JA, Bravo-Pérez D, Pineda-Ríos JM, Quezada-Salinas A, Ávila-Quezada G. 2018. Organisms associated with damage to post-harvest potato tubers. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 308-320.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1801-1

Primera publicación DOI: 02 de Mayo, 2018.

First DOI publication: May 02, 2018.

**Resumen.** La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos de mayor consumo humano a nivel mundial. El cultivo es amenazado desde sus inicios por distintos organismos; algunos de ellos ocasionan daños superficiales en los tubérculos, que reducen la calidad y apariencia lo que provoca el rechazo por el consumidor. De un total de 34 muestras de tubérculos de papa destinados para consumo humano, obtenidas mediante muestreo

**Abstract.** The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the crops with the highest human consumption worldwide. The crop is threatened from its beginnings by different organisms; some of them cause superficial damage to the tubers, which reduce the quality and appearance and causes rejection by the consumer. Out of a total of 34 potato tuber samples destined for human consumption, obtained through directed visual sampling, at the Central de Abastos de Ecatepec, microorganisms associated with some physical damage or superficial alteration were identified; in addition, of atypical spots on the surface of tubers. Of the total samples, in the 50% were identified bacterial damages caused by *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces* sp. In the 41% were identified fungi and protozoa like *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Clonostachys* sp., *Geotrichum* sp., and *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. 9% of the remaining samples, no organism related to the damage was identified.

visual dirigido, en la Central de Abastos de Ecatepec, se identificaron a los microorganismos asociados a algún daño físico o alteración superficial; además, de manchas atípicas en la superficie de tubérculos. Del total de las muestras en el 50% se identificaron a las bacterias *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptomyces* sp. En el 41% se identificaron a hongos y protozoarios como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Clonostachys* sp., *Geotrichum* sp., y *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. Del 9% de las muestras restantes no se identificó ningún organismo relacionado al daño.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum*, microorganismos, hongos, bacterias.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más utilizados para el consumo humano a nivel mundial. De este tubérculo se producen 381 millones de toneladas anualmente en el mundo (FAO, 2014). En México ocupa el quinto lugar en importancia alimenticia, superado por el maíz, trigo, frijol y arroz. Del total de la producción nacional, el 56% se destina para consumo en fresco, 29% para la industria y el 15% como semilla (Mora-Aguilar, 2014). A nivel mundial, se han reportado alrededor de 70 enfermedades y desordenes fisiológicos que afectan a este cultivo y causan severos daños especialmente en los tubérculos (Herrera y Scott, 1993; Stevenson, 2001). Entre los síntomas de las enfermedades que afectan tubérculos se identifican agallas, manchas y pudriciones (Fiers *et al.*, 2012), principalmente; estos pueden ser ocasionados por hongos, bacterias, nematodos y virus. Asimismo, existen otros factores que además de la apariencia física, demeritan la calidad de los tubérculos provocando el rechazo por el consumidor; sin embar-

**Key words:** *Solanum tuberosum*, microorganisms, fungi, bacteria.

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the crops with the highest human consumption worldwide. Every year, 381 million tons of this crop are produced worldwide (FAO, 2014). In Mexico, it is number five in terms of food importance, after maize, wheat, beans and rice. Out of the total of the country's production, 56% is used for consuming fresh, 29% for industrial use, and 15%, as a seed (Mora-Aguilar, 2014). Worldwide, roughly 70 diseases and physiological disorders have been reported to affect this crop and cause severe damages, particularly in tubers (Herrera and Scott, 1993; Stevenson, 2001). Some of the main symptoms of the diseases that affect tubers are root nodules, spots, and rotting (Fiers *et al.*, 2012), which may be caused by fungi, bacteria, nematodes and viruses. There are also other factors that, aside from the physical appearance, can downgrade the quality of the tubers, leading to rejection from consumers; however, Fiers *et al.* (2010) mentioned that surface spots only affect the epidermis of the tubers, and do not alter their taste or nutritional properties (Jemison *et al.*, 2008; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2013). Some of these surface alterations that affect the peridermis of the tubers are a result of the presence of pathogens such as *Colletotrichum coccodes*, *Helminthosporium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Spongospora* f. sp. *subterranea* and *Streptomyces* spp., as well as, in many cases, a means of entry for opportunist microorganisms that lead to the rotting of tubers. Fungi species such as *Fusarium* sp. frequently damage relevant damages to tubers on fields and in storage worldwide; in the latter, it may affect up to 60% of the production (Boyd, 1972). Other conditions may also appear that lead to poor quality and appearance. They may

go, Fiers *et al.*, (2010) mencionó que las manchas superficiales afectan solamente la epidermis de los tubérculos, sin alterar su sabor y propiedades nutricionales (Jemison *et al.*, 2008; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2013). Algunas de estas alteraciones superficiales que afectan la peridermis de los tubérculos son el resultado de la presencia de patógenos como *Colletotrichum coccodes*, *Helminthosporium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Spongospora* f. sp *subterranea* y *Streptomyces* spp.; además, de ser en muchos casos vía de entrada para otros microorganismos oportunistas que conducen a la pudrición de tubérculos. Especies de hongos como *Fusarium* sp., con frecuencia causan daños relevantes a nivel mundial en tubérculos que se encuentran en campo y almacenamiento, en esta última puede llegar a afectar hasta el 60% de la producción (Boyd, 1972). También se pueden presentar otras condiciones que provocan la mala calidad y apariencia, estas pueden ser debidas a daños mecánicos, por insectos, factores abióticos como la humedad y temperatura, el uso de productos químicos, deficiencias nutricionales, y otros daños que se desconocen sus causas, conocidos como manchas atípicas (Friedmans, 1960; Stevenson *et al.*, 2001; Fiers, 2010; Naerstad *et al.*, 2012). Por otra parte, las bacterias y hongos que ocasionan pudriciones o daños más severos en la peridermis de tubérculos, producen una amplia gama de enzimas como pectinasas, celulasas, xilanasas y proteasas, responsables de la maceración del tejido y muerte celular (Olivieri *et al.*, 2004). Los síntomas incluyen ya sea pudriciones secas o blandas, decoloración del tubérculo y pudrición anular, y son debidas a diversos hongos como *Fusarium* spp., *Verticillium* spp.; bacterias, como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum*, entre otras (de Haan *et al.*, 2008; Czajkowski *et al.*, 2011; Fiers *et al.*, 2012; Gashgari y Gherbawy, 2013). Debido a

be due to mechanical damages, insects, abiotic factors such as humidity and temperature, the use of chemical products, nutritional deficiencies, and other damages of unknown causes, known as atypical spots (Friedmans, 1960; Stevenson *et al.*, 2001; Fiers, 2010; Naerstad *et al.*, 2012). On the other hand, the bacteria and fungi that cause rotting or more severe damage to the peridermis of tubers produce a wide range of enzymes such as pectinases, cellulases, xylanases and proteases, responsible for the maceration of tissues and cell death (Olivieri *et al.*, 2004). Symptoms include dry or soft rotting, discoloring of the tuber and annular rotting, and they are caused by fungi such as *Fusarium* spp., *Verticillium* spp.; bacteria such as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum*, and others (de Haan *et al.*, 2008; Czajkowski *et al.*, 2011; Fiers *et al.*, 2012; Gashgari and Gherbawy, 2013). Due to the above, the aim of this study was to identify the microorganisms related to the symptoms and damages potato tubers in postharvest, produced for human consumption which can be found in commercial places, such as the Central de Abastos of Ecatepec.

**Sampling.** Potato tubers destined for human consumption were collected in August, 2017, from the Central de Abastos de Ecatepec, State of Mexico. For this, samples were taken, aimed at those that displayed some physical damage or superficial alteration, as well as atypical spots. Each tuber was wrapped in a paper towel and placed inside polyethylene bags. They were then transported to the Mycology and Bacteriology Lab of the National Plant Health Reference Center. They were classified according to the symptoms and/or typical damages caused by the presence of fungi, bacteria or insects, such as necrosis, dry rotting,



lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar a los microorganismos asociados a síntomas y daños en postcosecha de tubérculos de papa destinados para consumo humano que se pueden encontrar en sitios comerciales, como la Central de Abastos de Ecatepec.

**Muestreo.** Se recolectaron tubérculos de papa en agosto de 2017 destinados para consumo humano en la central de abastos de Ecatepec, Estado de México, para esto se realizó un muestreo dirigido a aquellos que presentaban algún daño físico o alternación superficial, además de manchas atípicas, cada tubérculo se envolvió en papel absorbente y depositados en bolsas de polietileno, inmediatamente fueron transportadas al laboratorio de Micología y Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, se clasificaron de acuerdo a los síntomas y/o daños típicos por la presencia de hongos, bacterias o insectos, como necrosis, pudriciones, pudriciones secas, manchas, lesiones corchosas, costras negras, obteniendo un total de 34 muestras, las cuales fueron procesadas el mismo día para su diagnóstico.

**Aislamiento de hongos.** De cada muestra sospechosa para hongos y bacterias se tomaron fotografías de los síntomas o daños. Posteriormente, de manchas en tubérculos y de la transición de tejido sano-enfermo se tomaron secciones de 1 cm<sup>2</sup>, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril por tres minutos cada uno y secaron en papel absorbente estéril, posteriormente se colocaron sobre medio PDA (agar-papa-dextrosa) contenido en cajas Petri de 90 x 15 mm. Por otra parte, para propiciar el desarrollo de microorganismos sobre el tubérculo, se realizaron cámaras húmedas de cada tubérculo y síntoma sembrado en PDA, se tomaron dos muestras de cada tubérculo

spots, corklike lesions, black scabs, obtaining a total of 34 samples, which were processed on the same day for their diagnosis.

**Isolation of fungi.** Photographs were taken of symptoms or damages from each sample suspected of having fungi and bacteria. Later, 1 cm<sup>2</sup> sections were taken from the stains in tubers and the transition from healthy to diseased tissue. They were disinfected with 4% sodium hypochlorite for 1 minute, washed three times with distilled water for 3 minutes each, and dried using sterilized paper towels. They were then placed in a PDA (potato-dextrose-agar) medium in 90 x 15 mm Petri-dishes. On the other hand, in order to promote the growth of microorganisms on the tuber, humidity chambers were performed for each tuber and symptom planted in PDA, two samples were taken from each tuber, and they were disinfested following the method described above. In both cases, incubation was performed at a temperature of 22±2 °C and a photoperiod of 12 hours. After five days, from the dishes that presented fungal culture, we performed monospore culture growth in new dishes with PDA. The identification was carried out using taxonomical codes and morphometric characteristics (Sneh *et al.*, 1991; Barnett and Hunter, 2006; Leslie and Summerell, 2006; Seifert and Gams, 2011).

In the case of tubers with symptoms of pustules and root nodules suspected to have been caused by *Spongospora subterranea*, the present structures were observed under the microscope, histological cuts were made, and permanent preparations were made for the identification of *S. subterranea* using taxonomic codes. To confirm the presence of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a PCR test was carried out using specific Sos1 (5'-CCTGGGTGC-GATTGTCTGTT-3') and Sps2 (5'-CACGCCAATGGTTAGA-GACG-3') primers reported by Bell *et al.* (1999).

y se desinfectaron siguiendo la metodología antes mencionada. En ambos casos la incubación se realizó a una temperatura de  $22\pm 2$  °C y fotoperíodo de 12 horas. Después de cinco días, de las cajas que presentaron desarrollo de colonias fúngicas, se realizaron cultivos monospóricos en nuevas cajas con PDA. La identificación se realizó mediante claves taxonómicas, y características morfométricas (Sneh *et al.*, 1991; Barnett y Hunter, 2006; Leslie y Summerell, 2006; Seifert y Gams, 2011).

En el caso de tubérculos con síntomas de pústulas y agallas sospechosas a las causadas por *Spongospora subterranea*, se observaron las estructuras presentes bajo el microscopio, se realizaron cortes histológicos y se elaboraron preparaciones permanentes para la identificación de *S. subterranea* mediante claves taxonómicas. Para confirmar la presencia de *Spongospora subterranea* f sp. *subterranea* se realizó una prueba de PCR utilizando iniciadores específicos Sos1 (5'-CCTGGGTGC-GATTGTCTGTT-3') y Sps2 (5'-CACGCCAAT-GGTTAGA-GACG-3') reportados por Bell *et al.* (1999).

**Aislamiento de bacterias.** Para realizar la identificación de bacterias se utilizaron tubérculos ya sea con presencia de pudrición o necrosis. Bajo la misma metodología descrita para el aislamiento de hongos se obtuvo las cepas bacterianas en medio B de King; de cada una se realizaron pruebas bioquímicas, mediante técnicas serológicas y enzimáticas (ELISA) (Schaad *et al.*, 2001); además, de pruebas de patogenicidad en tubérculos de papa (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Del total de las muestras analizadas el 50% resultó positivo a bacterias, el 41% a hongos y del 9% no se identificó ningún organismo relacionado al daño. En lo que respecta a hongos, se identificó a: *Fusarium* sp. (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. ver-*

**Isolation of bacteria.** In order to identify bacteria, tubers were used with signs of either rotting or necrosis. Using the same methodology described by the isolation of fungus, we obtained the bacterial strains in King's B agar; biochemical tests were run on each one, using serological and enzyme techniques (ELISA) (Schaad *et al.*, 2001), as well as pathogenicity tests in potato tubers (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Out of the total samples analyzed, 50% tested positive for bacteria, 41% for fungi, and 9% tested negative for any organism related to the damage. In regard to fungi, we identified: *Fusarium* sp. (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*), *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Clonostachys* sp., *Geotrichum* sp., and the protozoa *Spongospora subterranea* f sp. *subterranea* (Figures 1 and 2). The species *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, have been related previously to the colonization of the surfaces of tubers (Fiers *et al.*, 2010; Naerstad *et al.*, 2012; Gherbawy and Gashgari, 2013; Zimudzi *et al.*, 2017).

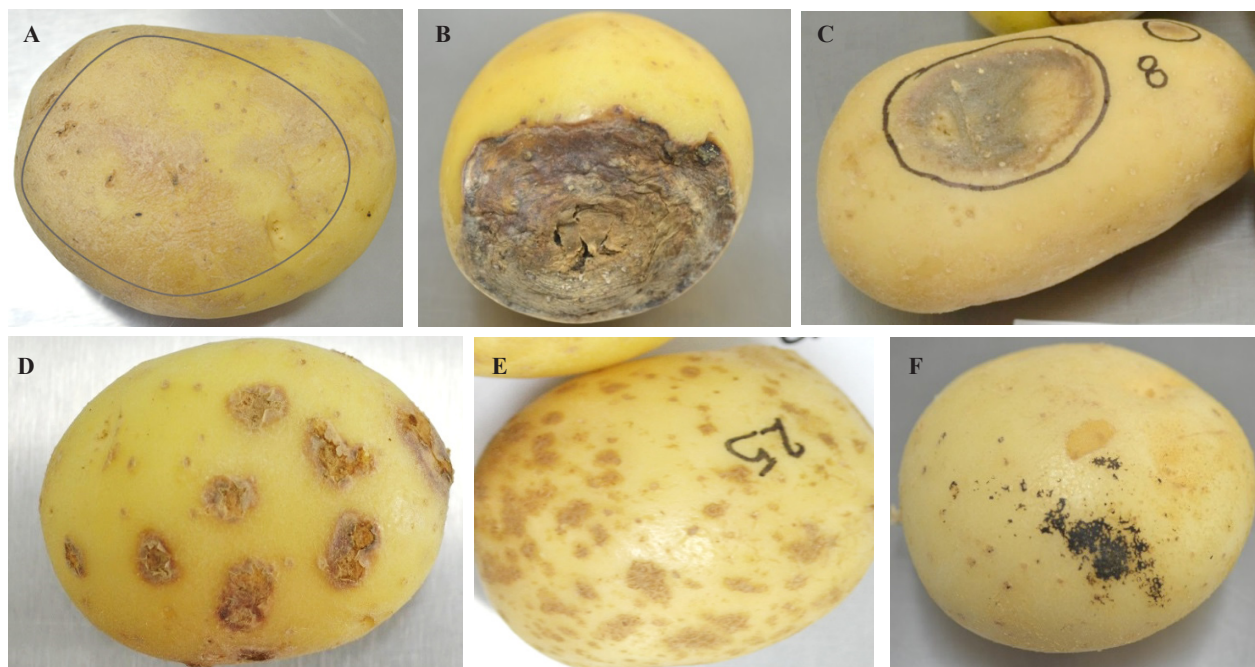
On the other hand, in the tubers that displayed symptoms of necrosis or rotting, we identified *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas fluorescens* (Figure 3). Likewise, the bacteria *Streptomyces* sp., was found in 11.7% of the tubers and only defined at the genus level. This bacteria is very commonly reported in potato tubers, and produces severe symptoms such as irregular, brown corklike lesions, or lesions in polyhedral shapes that can connect and give the tuber a poor appearance and quality (Fiers, 2010; Fiers *et al.*, 2010).

Potato tubers can display different surface damages that downgrade their commercial value. Some are caused by pathogens or insects, or by abiotic factors or another series of alterations of unknown causes, that is, physiological disorders.

ticillioides), *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Clonostachys* sp., *Geotrichum* sp., y al protozoario *Spongospora subterranea* f sp. *subterranea* (Figura 1 y 2). Las especies del *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, han sido asociadas anteriormente a colonizar la superficie de los tubérculos (Fiers *et al.*, 2010; Naerstad *et al.*, 2012; Gherbawy y Gashgari, 2013; Zimudzi *et al.*, 2017).

Por otra parte, de los tubérculos que presentaron síntomas de necrosis o pudrición, se identificó a *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas fluorescens* (Figura 3). Así también, en el 11.7% de los

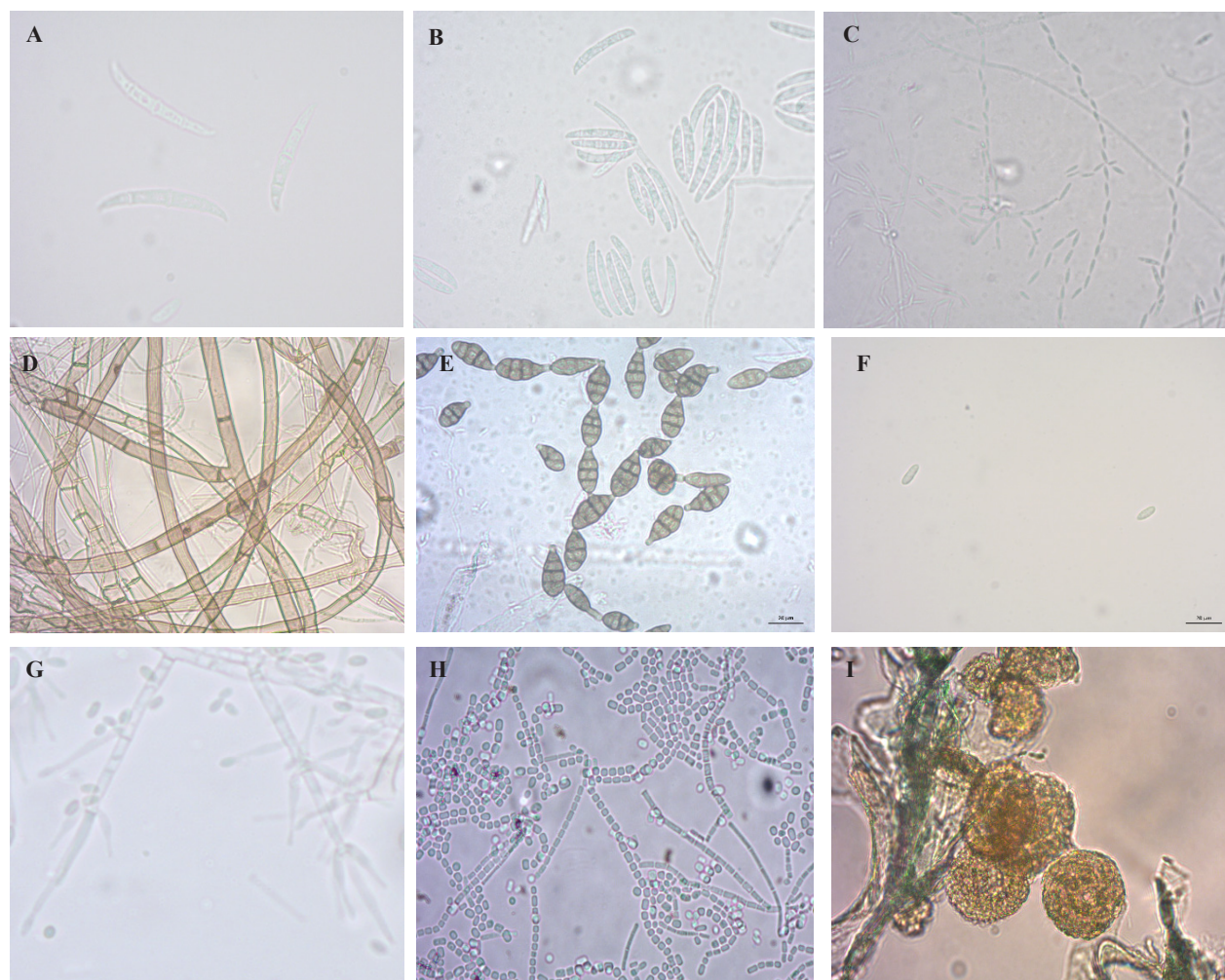
Fiers *et al.* (2010), reported *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Clonostachys* spp. as the most common genera that colonize the surface of potato tubers in storage conditions. Likewise, Gherbawy and Gashgari (2013), identified *Fusarium*, *Penicillium*, *Ilyonectria*, *Alternaria*, and *Rhizoctonia*, in a study, as the most common genera isolated in different types of symptoms in potato tuber spots. On the other hand, Naerstad *et al.* (2012) pointed out that the pathogens that most commonly produce spots in tubers, and reduce yield and quality, are *Rhizoctonia solani*, *Spongospora subterranea*



**Figura 1.** A) Tubérculos de papa con manchas oscuras superficiales, relacionadas a *Clonostachys* sp. y *Colletotrichum* sp. B) Pudriciones secas, donde se identificaron los hongos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., y *Geotrichum* sp. C) Hundimiento del corazón del tubérculo. D) Pústulas o costras circulares sobre la superficie del tubérculo características debidas a *Spongospora subterranea*. E) Manchas o lesiones corchosas en forma de figuras poliédricas, daños característicos de *Streptomyces* sp. F) Costras negras, duras similar a la tierra, que son esclerocios que forma *Rhizoctonia solani* sobre la peridermis del tubérculo.

**Figure 1.** A) Potato tubers with dark surface spots related to *Clonostachys* sp. and *Colletotrichum* sp. B) Dry rotting, where the fungi *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., and *Geotrichum* sp. were identified. C) Sinking of the heart of the tuber. D) Pustules or circular scabs on the surface of the tuber, characteristics caused by *Spongospora subterranea*. E) Spots or corklike lesions in polyhedral shapes, damages characteristically caused by *Streptomyces* sp. F) Hard, black scabs, similar to soil, that are sclerotia formed by *Rhizoctonia solani* on the periderm of the tuber.





**Figura 2. Microorganismos (hongos y protozoario) aislados de tubérculos de papa. A) Macroconidios de *Fusarium oxysporum*. B) Macroconidios de *Fusarium solani*. C) Conidios en cadena de *Fusarium verticillioides*. D) Hifas de *Rhizoctonia solani*. E) Conidios de *Alternaria* sp. F) Conidios de *Colletotrichum* sp. G) Fiálides y conidios de *Clonostachys* sp. H) Artroconidios de *Geotrichum* sp. I) Esporosorios de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea***  
**Figure 2. Microorganisms (fungi and protozoa) isolated from potato tubers. A) *Fusarium oxysporum* macroconidia. B) *Fusarium solani* macroconidia. C) *Fusarium verticillioides* chain conidia. D) *Rhizoctonia solani* hyphae. E) *Alternaria* sp., conidia. F) *Colletotrichum* sp., conidia. G) *Clonostachys* sp., phialides and conidia. H) *Geotrichum* sp., arthroconidia I) *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* sporosori.**

tubérculos se identificó a la bacteria *Streptomyces* sp., la cual, solo se determinó a nivel de género. Esta bacteria es muy común reportada en tubérculos de papa, que ocasionando severos síntomas como lesiones corchosas irregulares de color marrón, o lesiones en forma poliédrica que pueden llegar a unirse y proporcionan una mala apariencia y calidad (Fiers, 2010; Fiers *et al.*, 2010).

f. sp. *subterranea*, *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium* sp. and *Streptomyces* sp. Regarding *Fusarium* sp., the results obtained in this investigation coincide with reports from earlier studies, since it was identified as being one of the genera most frequently isolated from the peridermis of potato tubers (Chelkowski, 1989; Fiers *et al.*, 2010; Gherbawy and Gashgari,

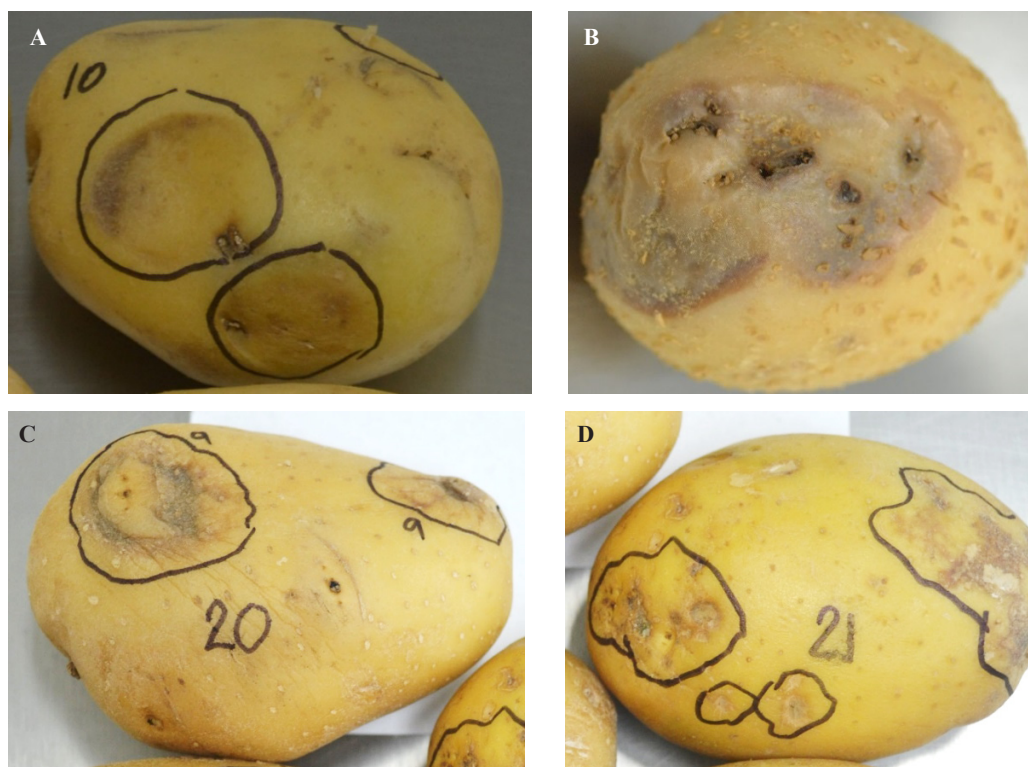


Figura 3. Tubérculos de papa con síntomas de necrosis en la peridermis del tubérculo, en todos los casos se aisló e identificó a las bacterias *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas fluorescens*.

Figure 3. Potato tubers with symptoms of necrosis in the peridermis of the tuber; in all cases, the bacteria *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas fluorescens* were identified.

En tubérculos de papa se pueden presentar diferentes daños superficiales que demeritan su valor comercial. Algunos son causados por patógenos o por insectos, o por factores abióticos y otra serie de alteraciones que se desconocen sus causas, es decir, desórdenes fisiológicos. Fiers *et al.* (2010), reportó a *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Clonostachys* spp., como los géneros más comunes que colonizan la superficie de tubérculos de papa en condiciones de almacenamiento. De igual forma, Gherbawy y Gashgari (2013), en un estudio realizado identificaron a *Fusarium*, *Penicillium*, *Ilyonectria*, *Alternaria*, y *Rhizoctonia*, como los géneros más comunes aislados en diferentes tipos de síntomas de manchas

2013; Zimundzi *et al.*, 2017) and the species *F. oxysporum* has been isolated from most of the cultivars studied (Manici and Cerato, 1994; Zimundzi *et al.*, 2017). Apart from *Fusarium* spp., other fungi were found to colonize the same spots of the tubers, such as *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Clonostachys* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Geotrichum* sp. The latter has not been reported to colonize or cause damages to the crop or potato tubers, but is found throughout the soil, although only one specie is important as a pathogenic agent: *Geotrichum candidum*, a specie that has been reported as the causaling agent of bitter rotting in post-harvest citrus fruits (Brown 1988; López-García *et al.*, 2003; Talibi *et al.*, 2012), as



en tubérculos de papa. Por su parte, Naerstad *et al.* (2012), señalaron que los patógenos más comunes que ocasiona manchas en tubérculos, reducen el rendimiento y calidad son: *Rhizoctonia solani*, *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium* sp. y *Streptomyces* sp. En cuanto a *Fusarium* sp., los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados en estudios previos ya que este se identificó como uno de los géneros más frecuentemente aislado en la peridermis de tubérculos de papa (Chelkowski, 1989; Fiers *et al.*, 2010; Gherbawy y Gashgari, 2013; Zimundzi *et al.*, 2017) y la especie *F. oxysporum* se ha aislado de la mayoría de los cultivares estudiados (Manici y Cerato, 1994; Zimundzi *et al.*, 2017). Además, de *Fusarium* spp, se identificó a otros hongos colonizando las mismas manchas de los tubérculos, como *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Clonostachys* sp., *Rhizoctonia solani*, y *Geotrichum* sp., este último no se ha reportado colonizando u ocasionando daños en el cultivo o tubérculos de papa, se encuentra cosmopolitamente en el suelo, pero solo una especie es importante como agente patogénico, *Geotrichum candidum*, especie que se ha reportado como el agente causal de la pudrición amarga de los cítricos en postcosecha (Brown 1988; López-García *et al.*, 2003; Talibi *et al.*, 2012); además, de pudriciones blandas en postcosecha en fresa (Fraire-Cordero *et al.*, 2003) y otros cultivos; por lo que se recomienda realizar estudios subsecuentes para poder determinar su condición patogénica. En el caso de tubérculos de papa, no se ha asociado como agente patogénico, y podría considerarse como contaminante en la superficie de los tubérculos de papa en postcosecha o como supresor de los microorganismos patogénicos en este estudio.

Los diferentes géneros y especies de hongos que se han identificado colonizando la superficie de la peridermis de tubérculos de papa; además de

well as soft rottings in post-harvest strawberry (Fraire-Cordero *et al.*, 2003) and other crops, and therefore, further studies are recommended in order to determine their pathogenic condition. In the case of potato tubers, it has not been related as a pathogenic agent, and could be considered as a pollutant on the surface of the potato tubers in post-harvest or as a suppressor of the pathogenic microorganisms in this study.

The different genera and species of fungi that have been identified as colonizing the surface of the periderm of potato tubers, not only have a pathogenic behavior on the crop, but some genera may have an antagonistic behavior with pathogenic organisms, which have been evaluated to determine their potential as biocontrol agents. The fungus *Clonostachys* spp., known for its antifungal capability and mycoparasitic action against pathogens, produces a wide range of volatile organic compounds. Studies show that *Clonostachys* sp. presents antibiosis and an effective colonization of the lesions caused by mechanical damages, avoiding the entry of pathogenic agents (Gan *et al.*, 2007; Assefa, 2013), and limiting the growth of other organisms in the potato tuber (Gan *et al.*, 2007). On the other hand, the species *Gliocladium roseum* (anamorph: *Clonostachys rosea*) has been reported as a pathogen in potato and a causing agent of dry rotting (Theron, 1991).

Danyluk *et al.* (2013), pointed out that the microbiota that dominates in freshly-harvested orchards is composed of bacteria *Enterobacter*, *Bacillus* spp., *Pantoea* spp., *Cyanobacterium*, *Erwinia* spp., *Pectobacterium* and *Pseudomonas*, resulting from contact with the soil, air and water. In the areas damaged by necrosis or rotting in some of the tubers collected in this investigation, bacteria were identified and we found a marked delimitation that stopped the rot from advancing, which may suggest that the antagonistic bacteria identified

tener un comportamiento patogénico en el cultivo, existen algunos géneros que pueden tener un comportamiento antagónico con organismos patogénicos, los cuales se han evaluado para determinar su potencial como agentes de biocontrol. El hongo *Clonostachys* spp., conocido por su capacidad antifúngica, y acción micoparasítica contra patógenos, produce una amplia variedad de compuestos orgánicos volátiles. Estudios demuestran que *Clonostachys* sp., presenta antibiosis y una efectiva colonización de las heridas ocasionadas por daños mecánicos, protegiendo de la entrada de agentes patogénicos (Gan *et al.*, 2007; Assefa, 2013), y limitando el crecimiento de otros organismos en el tubérculo de papa (Gan *et al.*, 2007). Por otro lado, la especie *Gliocladium roseum* (anamorfo: *Clonostachys rosea*) se ha reportado como patógeno en cultivos de papa y agente causal de pudriciones secas (Theron, 1991).

Danyluk *et al.* (2013), señalaron que la microbiota dominante sobre hortalizas recién cosechadas está constituida por bacterias *Enterobacter*, *Bacillus* spp., *Pantoea* spp., *Cyanobacterium*, *Erwinia* spp., *Pectobacterium* y *Pseudomonas*, provenientes del contacto con el suelo, agua y aire. En las áreas dañadas por necrosis o pudrición en algunos de los tubérculos colectados en este trabajo, se identificaron bacterias, se observó una delimitación marcada que detuvo el avance de la pudrición, lo que puede sugerir que las bacterias antagonistas identificadas *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas fluorescens* impidieron el crecimiento necrotrófico de algún agente patogénico que estuviera colonizando el tubérculo. El-Ghaouth *et al.* (1998) mencionaron que estos organismos no causan algún daño al estar en contacto con el tejido vegetal. Cabe señalar que se han reportado a distintas especies de *Enterobacter* spp., y *Pseudomonas fluorescens* como agentes de biocontrol debido a que pueden suprimir enfermedades como la pudrición seca en tubérculos de

as *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas fluorescens* stopped the necrotrophic growth of a pathogenic agent that may have been colonizing the tuber. El-Ghaouth *et al.* (1998) mentioned that these organisms cause no damage when in contact with plant tissues. It is worth pointing out that different species of *Enterobacter* spp. and *Pseudomonas fluorescens* have been reported as biocontrol agents, since they can cure diseases such as dry rotting in potato tubers, caused by *Fusarium* spp., by producing different antifungal metabolites (Schisler, 1994), and can also reduce the severity of the disease by up to 25% (Chelkowski, 1989; Schisler *et al.*, 1995; Schisler *et al.*, 2000). *Pseudomonas fluorescens* was also reported as a biocontrol agent for bacteria such as *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, since it produces the antimicrobial component 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), which inhibits the growth of this bacteria in *in vitro* conditions (Cronin *et al.*, 1997).

In 9% of the samples analyzed, no clear relation was established between a microorganism and the damages or symptoms in the tuber; symptoms were identified as brown cavings in the center of the tuber. The main causes of the physiological disorders are a response of the plant to stress, including inadequate cultural practices during planting, including the choice of susceptible cultivars, handling and storage, extreme temperatures, soil pH, humidity levels, and inadequate levels of nutrients (Fiers, 2010; Mikitzel, 2014). Zotarelli *et al.* (2013), mention that the leaching of nutrients such as nitrate lead to nutritional stress in the plant, leading to physiological alterations, such as the brown center, hollow heart, necrosis due to internal heat, cracking, and others.

The aim of this study was to identify the organisms related to damage in potato tubers. In conclusion, we found a diversity of pathogenic microorganisms colonizing one same tuber, as well

papa, ocasionada por *Fusarium* spp., al producir diferentes metabolitos antifúngicos (Schisler, 1994); además, puede reducir la severidad de la enfermedad hasta un 25% (Chelkowski, 1989; Schisler *et al.*, 1995; Schisler *et al.*, 2000). *Pseudomonas fluorescens* también se reportó como agente de biocontrol de bacterias como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* al producir el componente antimicrobiano 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) que inhibe el crecimiento de esta bacteria en condiciones *in vitro* (Cronin *et al.*, 1997).

En el 9% de las muestras analizadas, no se estableció una relación clara entre un microorganismo con los daños o síntomas en el tubérculo, los síntomas se identificaron como hundimientos en el centro del tubérculo de color marrón. Las principales causas de los desórdenes fisiológicos son una respuesta de la planta a estrés, estos incluyen prácticas culturales inadecuadas durante el cultivo, incluida la elección de los cultivares susceptibles, la manipulación o almacenamiento, temperaturas extremas, el pH del suelo, niveles de humedad y niveles de nutrientes inadecuados (Fiers, 2010; Mitzel, 2014). Zotarelli *et al.* (2013), mencionaron que debido a la lixiviación de nutrientes como el nitrato conduce a un estrés nutricional de la planta, lo que da lugar a alteraciones fisiológicas, como son el centro marrón, corazón hueco, necrosis por el calor interno, agrietamiento, entre otros.

El objetivo de este estudio fue identificar los organismos asociados a daños en tubérculos de papa. En conclusión, se encontró una diversidad de microorganismos patogénicos colonizando un mismo tubérculo; además de distintas bacterias conocidas por ser antagonicas de microorganismos patógenos. En este estudio el hongo *Alternaria* sp., se aisló con mayor frecuencia en los tubérculos colectados. Se encontraron asociados de manera consistente ya sea síntomas de necrosis o pudriciones, o ambos a las bacterias antagonicas *Enterobacter aerogenes* y

as different bacteria known for being antagonistic of pathogenic microorganisms. In this study, the fungus *Alternaria* sp. was isolated more frequently in the tubers collected. Symptoms of either necrosis or rotting, or both, were found to be consistently associated to the antagonistic bacteria *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas fluorescens*, limiting the advancement of the necrosis in the potato tuber tissue. However, further research is required to understand the interaction of these organisms on the surface of potato tubers.

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

Pseudomonas fluorescens, limitando el avance de la necrosis en el tejido del tubérculo de papa; sin embargo, se requiere más investigación para conocer la interacción de estos organismos en la superficie de los tubérculos de papa.

LITERATURA CITADA

- Assefa JT. 2013. Postharvest Biological control of *Fusarium* dry-rot diseases in potato tubers using *Clonostachys rosea* strain IK726. Disponible en línea: https://stud.epsilon.slu.se/5248/12/assefa-jima_t_130130.pdf (consulta, octubre 2017).
- Barnett HL and Hunter BB. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th. (Ed.), APS Press. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Bell KS, Roberts J, Verrall S, Cullen DW, Williams NA, Harrison JG and Claxton JR. 1999. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. European Journal of Plant Pathology 105:905-915. <https://doi.org/10.1023/A:1008782309333>
- Boyd AEW. 1972. Potato storage diseases. Review of Plant Pathology 51:297-321. Disponible en línea: <https://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2006/20063049509.pdf>
- Brown GE. 1988. Efficacy of guazatine and iminocadine for control of postharvest decays of oranges. Plant Disease 72:906-908. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1988Articles/PlantDisease72n10_906.PDF
- Chelkowski J. 1989. Toxinogenic of *Fusarium* species causing dry rot of potato tubers. Pp 435-440. In: Chelkowski J. (ed.). *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier Publishing Company, New York, USA. 492 p. <https://doi.org/10.1002/food.19900340624>

- Cronin D, Moënne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN and O'gara F. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2, 4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiology Ecology 23:95-106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00394.x>
- Czajkowski R, Perombelon MC, van Veen JA and van der Wolf JM. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. Plant pathology 60:999-1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>
- Danyluk MD, Fatica MK, Brar PK, McEgan R, Valadez AM, Schneider KR and Trinetta V. 2013. Fruits and Vegetables. Chapter 50. In: Salfinger Y and Tortorello ML. (Eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th edition. American Public Health Association (APHA Press). Washington, D.C. USA. 515,533,561pp. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.055>
- El-Ghaouth A, Wilson CL and Wisniewski M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology 88:282-291. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.282>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2014. FAOSTAT. Food and agriculture data. Disponible en línea: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (consulta, octubre 2017).
- Fiers M. 2010. Origins of the blemishes of potato tubers: from the soil microbiology to the pedoclimatic environment. Food and Nutrition. Université de Bourgogne, France. 261p. Disponible en línea: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00572491/document> (consulta, octubre 2017).
- Fiers M, Chatot C, Edel-Hermann V, Le Hingrat Y, Konate AY, Gautheron N and Steinberg C. 2010. Diversity of microorganisms associated with atypical superficial blemishes of potato tubers and pathogenicity assessment. European Journal of Plant Pathology 128:353-371. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9657-2>
- Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Le Hingrat Y, Alabouvette C and Steinberg C. 2012. Potato soil-borne diseases. A review. Agronomy for Sustainable Development 32:93-132. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0035-z>
- Friedmans BA. 1960. Market diseases of fresh fruits and vegetables. Economic Botany 14:145-156. <https://doi.org/10.1007/BF02860016>
- Fraire-Cordero MDL, Yáñez-Morales MDJ, Nieto-Angel D y Vázquez-Gálvez G. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21:285-291. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/html/612/61221307>
- Gan Z, Yang J, Tao N, Liang L, Mi Q, Li J and Zhang KQ. 2007. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Applied Microbiology and Biotechnology 76:1309-1317. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1111-9>
- Gashgari RM and Gherbawy YA. 2013. Pathogenicity of some *Fusarium* species associated with superficial blemishes of potato tubers. Polish Journal of Microbiology 62:59-66.
- Gherbawy YA and Gashgari RM. 2013. Mycobiota associated with superficial blemishes of potato tubers. Food Biotechnology 27:137-151. <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.781947>
- Goszczyńska T, Serfontein JJ and Serfontein S. 2000. Introduction to practical phytobacteriology; a manual for phytobacteriology by SAFRINET, SDC Switzerland. 83p. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/237021880_Introduction_to_Practical_Phytobacteriology_A_manual_for_phytobacteriology
- de Haan EG, Dekker-Nooren TC, van den Bovenkamp GW, Speksnijder AG, van der Zouwen PS and van der Wolf JM. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. European Journal of Plant Pathology 122:561. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9325-y>
- Herrera JE and Scott GJ. 1993. Factores limitantes a la producción y usos de la papa: resultados de la encuesta a los programas nacionales de América Latina. Revista Latinoamericana de la papa 5:122-134. Disponible en línea: <http://www.papaslatinas.org/ojs/index.php/rev-alap/article/viewFile/63/65>
- Jemison Jr JM, Sexton P and Camire ME. 2008. Factors influencing consumer preference of fresh potato varieties in Maine. American Journal of Potato Research 85:140-149. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9017-3>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA. 388p. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470278376.fmatter/pdf> (consulta, octubre 2017).
- López-García B, Veyrat A, Pérez-Payá E, González-Candelas L and Marcos JF. 2003. Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. International Journal of Food Microbiology 89:163-170. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00118-1)
- Manici LM and Cerato C. 1994. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* isolates from tubers and potato plants. Potato Research 37:129-134. <https://doi.org/10.1007/BF02358713>
- Mikitzel L. 2014. Tuber physiological disorders. Chapter 14. Pp: 237. In: Navarre R, Pavek MJ. (eds.). The Potato: Botany, Production and uses. CABI, USA. 382p. <http://doi.org/10.1079/9781780642802.0000>
- Mora-Aguilar R. 2014. Consumo y mercado de la papa en México. XXVI Congreso bienal de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP). Disponible en línea: <https://consumoymercadodepapa.wordpress.com/2014/11/28/consumo-y-mercado-de-la-papa-en-mxico/> (consulta, abril 2018).
- Naerstad R, Dees MW, Le VH, Holgado R and Hermansen A. 2012. Occurrence of skin blemish diseases (scab and scurf) in Norwegian potato production. Potato Research 55:225-239. <http://doi.org/10.1007/s11540-012-9221-x>
- Olivieri FP, Maldonado S, Tonon CV and Casalongue CA. 2004. Hydrolytic activities of *Fusarium solani* and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* Associated with the Infection Process of Potato Tubers. Journal of Phytopathology 152:337-344. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00851.x>

- Schisler DA. 1994. Selection and performance of bacterial strains for biologically controlling Fusarium dry rot of potatoes incited by *Gibberella pulicaris*. *Plant Disease* 78:251-255. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0251>
- Schisler DA, Kurtzman CP, Bothast RJ and Slininger PJ. 1995. Evaluation of yeasts for biological control of Fusarium dry rot of potatoes. *American Journal of Potato Research*, 72:339-353. <https://doi.org/10.1007/BF02849331>
- Schisler DA, Slininger PJ, Kleinkopf G, Bothast RJ and Ostrowski RC. 2000. Biological control of Fusarium dry rot of potato tubers under commercial storage conditions. *American Journal of Potato Research* 77:29-40. <https://doi.org/10.1007/BF02853659>
- Schaad NW, Jones JB and Chum W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Ed. APS Press, St. Paul, MN, USA 398p.
- Seifert KA and Gams W. 2011. The genera of Hyphomycetes-2011 update. *Persoonia* 27:119-129. <http://dx.doi.org/10.3767/003158511X617435>
- Sneh B, Burpee L and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. 3rd print. APS press. St Paul, Minnesota, USA. 133p.
- Stevenson WR, Loria R, Franc GD and Weingartner DP. 2001. Compendium of potato diseases. Second Edition. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. 144p. <http://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.06934.x>
- Theron DJ. 1991. Dry rot of potatoes caused by *Gliocladium roseum*. *Plant Pathology* 40:302-305. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02380.x>
- Talibi I, Askarne L, Boubaker H, Boudyac, EH, Msanda F, Saadi B, Ait Ben and Aoumar A. 2012. Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology* 55:155-161. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03273.x>
- Vázquez-Carrillo MG, Rubio-Cobarruvias OA, Salinas-Moreno y Santiago-Ramos D. 2013. Usos alternativos de la papa en el Estado de México Disponible en línea: https://www.researchgate.net/profile/David_Santiago-Ramos/publication/260437185_Usos_alternativos_de_la_papa_en_el_Estado_de_Mexico/links/004635315013a361e4000000/Usos-alternativos-de-la-papa-en-el-Estado-de-Mexico.pdf (consulta, octubre 2017).
- Zimudzi J, Coutinho TA and Van der Waals JE. 2017. Pathogenicity of Fungi Isolated from Atypical Skin Blemishes on Potatoes in South Africa and Zimbabwe. *Potato Research* 60:119-144. <https://doi.org/10.1007/s11540-017-9345-0>
- Zotarelli L, Reyes-Cabrera JE, Worthington CM, Hutchinson C, Byrd S, Gergela D y Rowland DL. 2013. Trastornos fisiológicos de la papa-Necrosis por calor interno. Departamento del Ciencias para la Horticultura, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. (UF/IFAS). 4p. Disponible en línea: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS122100.pdf> (consulta, octubre 2017).

Leafhoppers that carry begomoviruses on roselle crop (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Cicadélidos portadores de begomovirus en el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Julieta Martínez-Cruz, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez*, Javier Hernández-Morales, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México; **Erika Janet Zamora-Macorra**, Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230, Texcoco, Estado de México; **Sergio Ramírez-Rojas**, Campo Experimental Zacatepec: CEZACA-INIFAP Km. 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana; CP. 62780, Colonia Centro; Zacatepec, Morelos. * Autor para correspondencia: ldaniel@colpos.mx

Recibido: 25 de Enero, 2018.

Aceptado: 24 de Abril, 2018.

Martínez-Cruz J, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J, Zamora-Macorra EJ, Ramírez-Rojas S. 2018. Leafhoppers that carry begomoviruses on roselle crop (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 321-330.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1801-4

Primera publicación DOI: 03 de Mayo, 2018.

First DOI publication: May 03, 2018.

Resumen. Los virus del género *Begomovirus* tienen una distribución mundial y a la fecha se sabe que son transmitidos exclusivamente por *Bemisia tabaci*. En 2016, se reportó un complejo de begomovirus asociados al amarillamiento de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en México, entre los que se encuentra el *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV). Con el propósito de conocer la entomofauna asociada al cultivo de jamaica portadora de begomovirus, se colectaron insectos en plantas con amarillamiento, aclaramiento de nervaduras y mosaico y se analizaron mediante PCR. Se

Abstract. The viruses of the *Begomovirus* genus have a worldwide distribution and to date it is known that they are transmitted exclusively by *Bemisia tabaci*. In Mexico, in 2016, a complex of begomoviruses associated with the yellowing of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) was reported, in which *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) is present. The objective of this study was to know the carrier insects of begomoviruses associated with roselle. Insects were collected from plants with yellowing, vein clearing and mosaic and analyzed by PCR. Three species of leafhoppers that carry OYMMV were identified: *Trypanalebra maculata*, *Kunzeana scimetara* and *Agallia excavata*. In *T. maculata* and *A. modesta*, *Sida golden mosaic Buckup virus* (SiGMBuV) and *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV) were detected, respectively. This is the first report of leafhoppers as carriers of begomoviruses.

Key words: virus vector insects, *Agallia*, *Trypanalebra*, *Kunzeana*.

identificaron tres especies de cicádelidos portadoras de OYMMV: *Trypanalebra maculata*, *Kunzeana scimetara* y *Agallia excavata*. Asimismo, se encontró que *T. maculata* y *A. modesta* son portadoras de los begomovirus *Sida golden mosaic Buckup virus* (SiGMBuV) y *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV), respectivamente. Este es el primer reporte de cicádelidos portadores de begomovirus.

Palabras clave: insectos vectores de virus, *Agallia*, *Trypanalebra*, *Kunzeana*.

El género *Begomovirus* pertenece a la familia *Geminiviridae*, el cual comprende patógenos que poseen genomas circulares de DNA monocatenario compuesto por uno o dos componentes de 2700-3000 pb, contenidos dentro de partículas icosaédricas (geminadas) incompletas. Son responsables de diversas enfermedades en cultivos de importancia económica en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Moffat, 1999). Con base en su gama de hospedantes, insecto vector, organización de su genoma y similitud de secuencias, la familia *Geminiviridae* se divide en siete géneros (Varsani *et al.*, 2009; Varsani *et al.*, 2014). Uno de éstos es el género *Begomovirus* que agrupa más de 60 especies transmitidas exclusivamente por un complejo de especies de *Bemisia tabaci* (Markham *et al.*, 1994). En México, la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un cultivo de gran importancia económica, Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, son los municipios con mayor superficie cultivada a nivel nacional (SIAP, 2015). En el ámbito mundial se reportan cuatro virus asociados al cultivo, *Cotton leaf curl virus* (CLCuV), *Malva vein clearing virus* (MVCV) (Brunt *et al.*, 1996), *Okra mosaic virus* (OkMV) (Stephan *et al.*, 2008) y *Mesta yellow vein mosaic virus* (MYVMV) (Chatterjee *et al.*, 2008). En México, se consignó un complejo de begomovirus asociados

The *Begomovirus* genus belongs to the Geminiviridae family, which includes pathogens that have circular genomes of single-stranded DNA with one or two components of 2700-3000 pb within incomplete icosahedral particles (geminated). They are responsible for several diseases that affect economically important crops in tropical and subtropical regions worldwide (Moffat, 1999). Based on its host range, insect vector, genomic composition and sequence similarity, the Geminiviridae family is divided into seven genera (Varsani *et al.*, 2009; Varsani *et al.*, 2014). One of them is the *Begomovirus* genus that includes over 60 species exclusively transmitted by a *Bemisia tabaci* species complex (Markham *et al.*, 1994). In Mexico, roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is a crop of great economic importance, and Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, are the municipalities with the greatest cultivated area at the national level (SIAP, 2015). Worldwide, four viruses associated with this crop have been reported: *Cotton leaf curl virus* (CLCuV), *Malva vein clearing virus* (MVCV) (Brunt *et al.*, 1996), *Okra mosaic virus* (OkMV) (Stephan *et al.*, 2008) and *Mesta yellow vein mosaic virus* (MYVMV) (Chatterjee *et al.*, 2008). In Mexico, a begomovirus complex was found associated with roselle yellowing, including *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) (Velázquez *et al.*, 2016). In the 2015 cycle, the disease was detected in two plots in Tecoaapa with 100% incidence. Whitefly populations are very low on crops in that production area. Based on this, the objective of the present study was to find out if there are other insects that carry OYMMV or other begomoviruses.

In 2016, two samplings of the municipalities of Tecoaapa and Ayutla, Guerrero, were done (Table 1). The first sampling took place in the 2015 cycle, from August 3 to 5, when the crop was in its vegetative stage, in locations where there was

al amarillamiento de la jamaica, entre los cuales se encuentra *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) (Velázquez *et al.*, 2016). En el ciclo 2015 esta enfermedad se presentó en dos parcelas de Tecoaapa con una incidencia de 100%. Siendo además muy bajas las poblaciones de mosquita blanca en el cultivo en esa zona productora. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue conocer si existen otros insectos portadores de OYMMV u otros begomovirus.

Durante 2016 realizaron dos recorridos en los municipios de Tecoaapa y Ayutla, Guerrero (Cuadro 1). El primero del 3 al 5 de agosto cuando el cultivo se encontraba en etapa vegetativa en localidades donde se tuvo una alta incidencia de plantas con amarillamiento en el ciclo 2015. El segundo recorrido se hizo del 26 al 28 de noviembre en la época de cosecha de cálices en sitios donde la incidencia de amarillamiento fue alta en el ciclo 2016. En todos los casos se colectaron insectos de plantas de jamaica y maleza adyacente a ellas que mostraban amarillamiento, aclaramiento de nervaduras y mosaico con una red de golpeo y se colocaron en envases de plástico que contenían etanol 96%. En el laboratorio los insectos se separaron con base en sus semejanzas morfológicas y se mantuvieron a -20 °C. Se tomaron de 2 a 3 individuos de cada grupo de insectos y se extrajo DNA total con CTAB (Sambrook y Rusell, 2001). El resto de los insectos de cada grupo se mantuvieron en alcohol para su posterior identificación en caso de resultar positivos por PCR para begomovirus con el par de iniciadores universales AV494/AC1048 y las condiciones de amplificación reportadas por Wyatt y Brown (1996) que amplifican un fragmento de 550 pb. Los productos amplificados fueron secuenciados y comparados con la base de datos del GenBank. Los insectos que resultaron positivos a begomovirus fueron montados e identificados con claves taxonómicas (Cuadro 1) y fotografiados con un microscopio óptico.

a high incidence of plants showing yellowing. The second sampling took place during the 2016 cycle, from November 26 to 28, when calyces were being harvested, in plots where the incidence of yellowing was high. In all cases, insects were collected with a sweep net from roselle plants and surrounding weeds showing yellowing, vein clearing and mosaic, and placed in plastic containers containing 96% ethanol. In the laboratory, the insects were separated according to their morphological similarities and kept at -20 °C. Total DNA was extracted from 2 or 3 individuals in each insect group using CTAB (Sambrook and Rusell, 2001). The remaining insects in each group were kept in ethanol to be identified later, in case they tested positive for begomoviruses through PCR using AV494/AC1048 universal primers and under the amplification conditions reported by Wyatt and Brown (1996), which amplify a 550 pb fragment. The amplified products were sequenced and compared to those in the GenBank database. The insects that tested positive for begomoviruses were mounted, identified using taxonomic keys (Table 1) and photographed using an optical microscope.

During the first sampling, insects of the Thysanoptera (207 individuals), Coleoptera (76 individuals) and Hemiptera orders were found. Four families of the Hemiptera order were identified: Membracidae (17 individuals), Pyrrhocoridae (62 individuals from the *Dysdercus* genus) and Aleyrodidae and Cicadellidae. Pérez *et al.* (2009) studied the entomofauna associated with roselle in Chiautla de Tapia, Puebla, and reported 17 species belonging to six orders, 11 families and 19 genera. The authors reported *Atta mexicana*, *Sphenarium purpurascens*, *Melanoplus* spp. and *Aphis gossypii* as pests that cause considerable damage to the roselle crop, but they were not found in this study. The density of leafhoppers observed was higher than that of whiteflies.

Cuadro 1. Insectos del orden Hemiptera asociados a jamaica en 11 localidades de dos municipios de Guerrero.
Table 1. Insects of the Hemiptera order associated with roselle at 11 locations in two municipalities of Guerrero.

| Insectos | Ayutla | | | | | | | | | | | | Tecoanapa | | | | | | | | Total | | | |
|--------------------------------|----------------------|----------------|------------|----|---------|-----------|----|----------------|---|------------|---|-------------|-----------|--------------|----|-----------|-----|---------|----|---------|-------|----|-----|----|
| | San José La Hacienda | | San Miguel | | Cortijo | Cotzalzin | | Tutepec | | El Salitre | | Cuanacasapa | | Xalpatlauhac | | Colotepec | | Apantla | | Pericon | | | | |
| | A ^v | B ^w | A | B | | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B |
| <i>Trypanalebra maculata</i> | 97 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | - ^x | - | 0 | - | 2 | - | 11 | 3 | - | 44 | - | 2 | - | - | 8 | 148 | 23 |
| <i>Kunzeana scimetara</i> | 3 | 2 | 0 | 46 | 1 | 4 | 3 | - | - | 2 | - | 9 | - | 13 | 20 | - | 12 | - | 6 | - | - | 11 | 45 | 87 |
| <i>Agallia</i> sp. | 2 | 3 | 0 | 11 | 0 | 3 | 4 | - | - | 0 | - | 2 | - | 3 | 3 | - | 27 | - | 2 | - | - | 20 | 38 | 42 |
| Otros cicadélidos ^y | 5 | 0 | 2 | 34 | 2 | 1 | 8 | - | - | 0 | - | 6 | - | 10 | 28 | - | 20 | - | 7 | - | - | 1 | 72 | 52 |
| Moscas blancas ^z | 57 | 1 | 2 | 5 | 2 | 5 | 0 | - | - | 1 | - | 17 | - | 2 | 8 | - | 8 | - | 1 | - | - | 10 | 78 | 41 |
| Total | 164 | 6 | 5 | 98 | 5 | 13 | 16 | - | - | 3 | - | 36 | - | 39 | 62 | - | 111 | - | 18 | - | - | 50 | | |

^vA: primera colecta: 3-5 de agosto 2016 / ^vA: first sampling: August 3-5, 2016.

^wB: segunda colecta: 26-28 de noviembre 2016 / ^wB: second sampling: November 26-28, 2016.

^x-: sitio no muestreado / ^x-: site not sampled.

^y Cicadélidos no identificados / ^y Unidentified leafhoppers.

^z Complejo de moscas blancas / ^z Whitefly complex.

En el primer recorrido se encontraron insectos de los órdenes Thysanoptera (207 individuos), Coleoptera (76 individuos) y Hemiptera; de este último se identificaron cuatro familias: Membracidae (17 individuos), Pyrrhocoridae (62 individuos del género *Dysdercus*), Aleyrodidae y Cicadellidae. Pérez *et al.* (2009) estudiaron la entomofauna asociada a jamaica en Chiautla de Tapia, Puebla y reportan 17 especies pertenecientes a seis órdenes, 11 familias y 19 géneros. Estos autores mencionan a *Atta mexicana*, *Sphenarium purpurascens*, *Melanoplus* spp. y *Aphis gossypii* como plagas que ocasionan daños considerables al cultivo, las cuales no fueron encontradas en el presente estudio. Se observó que la densidad de cicadélidos fue mayor que las de mosca blanca.

En la primera colecta se analizaron por PCR 45 grupos de insectos de los cuales en ocho se observó el fragmento esperado de 550 pb para begomovirus mediante esta prueba. En insectos obtenidos durante el primer muestreo se detectó al *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) en *Trypanalebra maculata*, *Agallia* sp., *Kunzeana scimetara* y *A. excavata*, mientras que en *A. modesta* se encontró a *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV) (Figura 1, Cuadro 2). MCLCuV fue reportado por Brown *et al.* (2001) en Guatemala y sugieren que se trata de una nueva especie derivada del grupo *Squash leaf curl virus* (SLCV) que incluye begomovirus bipartitas nativos de América Central y México. MCLCuV no se había detectado antes en jamaica ni en maleza asociada a este cultivo en la zona de estudio. En el segundo muestreo se encontró a OYMMV en *T. maculata* colectada en las localidades de San Miguel y Cortijo. En *Agallia* sp. procedente de Cortijo se encontró a *Sida golden mosaic Backup virus* (SiGMBuV). Stewart *et al.* (2014) señalan que plantas del género *Sida* son hospedantes de SiGMBuV; sin embargo, Ortega *et al.*, (2017) detectaron a OYMMV en plantas de *Sida collina*, *S.*

From the first batch of insects collected, 45 groups of insects were analyzed by PCR, 8 of which were found to have the expected 550-pb fragment of begomovirus. On insects obtained from the first sampling, *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) was detected in *Trypanalebra maculata*, *Agallia* sp., *Kunzeana scimetara* and *A. excavata*, while in *A. modesta* we found *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV) (Figure 1, Table 2). MCLCuV was reported by Brown *et al.* (2001) in Guatemala, and they suggested that it is a new species derived from the *Squash leaf curl virus* (SLCV) group that includes bipartite begomoviruses native to Central America and Mexico. MCLCuV had not been detected before in roselle or in weeds associated with it in the study area. In the second sampling, OYMMV was found in *T. maculata* collected in San Miguel and Cortijo. *Sida golden mosaic Backup virus* (SiGMBuV) was found in *Agallia* sp. from Cortijo. Stewart *et al.* (2014) point out that plants of the *Sida* genus are SiGMBuV hosts. However, Ortega *et al.* (2017) detected OYMMV in *Sida collina*, *S. aggregata*, *S. acuta*, *S. hankeana* and *Malacra fasiata* plants that were associated with roselle crops in the study area, but no SiGMBuV. This may be due to the fact that OYMMV has a higher transmission efficiency or is better able than SiGMBuV to infect the diversity of *Sida* species in this region. The four insect species that tested positive for begomoviruses belong to the Cicadellidae family. *T. maculata* and *K. scimetara* belong to the Typhlocybinae subfamily, which includes the *Empoasca* genus, including *E. papayae* (Acosta *et al.*, 2017) and *E. devastans* (Hague and Parasram, 1973), known to be the vector of 16SrII phytoplasma that causes papaya bunchy top (PBT) disease (Acosta *et al.*, 2017). Another species from this subfamily known to be a phytoplasma vector is *Alebroides nigroscutellatus*, which transmits the phytoplasma Potato purple top roll (16SrIII-B)

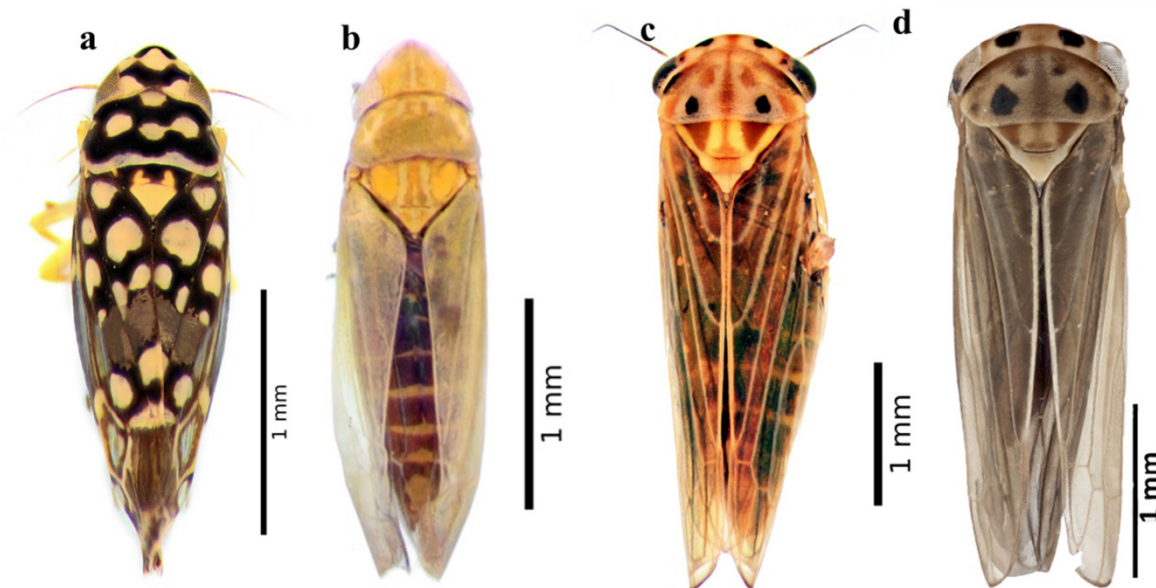


Figura 1. Cicadélidos asociados a jamaica positivos a begomovirus colectados en diferentes localidades de Ayutla y Tecoa-
na, Guerrero. a) *Trypanalebra maculata*; b) *Kunzeana scimetara*; c) *Agallia excavata*; d) *A. modesta*.

Figure 1. Leafhoppers associated with roselle that were collected at different locations in Ayutla and Tecoa-
nana, Guerrero, and tested positive for begomoviruses. a) *Trypanalebra maculata*; b) *Kunzeana scimetara*; c) *Agallia excavata*; d) *A. modesta*.

Cuadro 2. Begomovirus detectados en cicadélidos colectados en plantas de jamaica y maleza con síntomas de amarillamien-
to en dos municipios de Guerrero, México.

Table 2. Begomoviruses detected on leafhoppers collected from roselle plants and weeds showing yellowing symptoms in
two municipalities of Guerrero, Mexico.

| Cicadélido | Primer muestreo | | | | Segundo muestreo | | | |
|------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------|------------|-------------------------|---------------------|------------------|-------------------|
| | Localidad/
Municipio | Virus | Similitud
(%) | No. acceso | Localidad/
Municipio | Virus | Similitud
(%) | No. acceso |
| <i>Trypanalebra maculata</i> | San José La Hacienda/
Ayutla | OYMMV ^w | 95 | MG647809 | San Miguel/
Ayutla | OYMMV | 96 | MG647814 |
| | | | | | Cortijo/
Ayutla | SiGMBV ^y | 92 | S.N. ^z |
| <i>Agallia</i> sp. | San José La Hacienda/
Ayutla | OYMMV | 95 | MG647810 | Cortijo/
Ayutla | SiGMBV | 90 | MG647815 |
| <i>Kunzeana scimetara</i> | Xalpatlauhac /
Tecoanapa | OYMMV | 97 | MG647811 | | | | |
| <i>A. excavata</i> | Colotepec/
Tecoanapa | OYMMV | 94 | MG647812 | | | | |
| <i>A. modesta</i> | Colotepec/
Tecoanapa | MCLCV ^x | 90 | MG647813 | | | | |

^wOYMMV: Okra yellow mosaic Mexico virus / ^wOYMMV: Okra yellow mosaic Mexico virus.

^xMCLCuV: Melon chlorotic leaf curl virus / ^xMCLCuV: Melon chlorotic leaf curl virus.

^ySiGMBuV: Sida golden mosaic Backup virus / ^ySiGMBuV: Sida golden mosaic Backup virus.

^zNS: No asignado aún por el GenBank / ^zNS: Not yet assigned by the GenBank.

aggregata, *S. acuta*, *S. hankeana* y *Malacra fasiata* asociadas al cultivo de jamaica en la zona de estudio, pero no al SiGMBuV. Lo anterior puede deberse a que el OYMMV posee una mayor eficiencia de transmisión o una mejor capacidad de infectar a las diversas especies de *Sida* que el SiGMBuV en esta región. Las cuatro especies de insectos positivas a begomovirus pertenecen a la familia Cicadellidae. *T. maculata* y *K. scimetara* pertenecen a la subfamilia Typhlocybinæ, dentro de la cual se encuentra el género *Empoasca* que incluye a *E. papayae* (Acosta *et al.*, 2017) y *E. devastans* (Hague y Parasram, 1973) conocidas como vectoras del fitoplasma 16SrII causante de la enfermedad papaya bunchy top (PBT) (Acosta *et al.*, 2017). Otra especie conocida como vectora de fitoplasma dentro de esta subfamilia es *Alebroides nigroscutellatus* que transmite el fitoplasma Potato purple top roll (16SrIII-B) (Rojas, 2009). A la fecha no hay reportes de virus transmitidos por especies de esta subfamilia. Dietrich (2013) menciona que los miembros de la subfamilia Typhlocybinæ se alimentan preferentemente de las células del parénquima, lo cual sugeriría que hay poca o nula probabilidad de que adquirieran a los begomovirus que están limitados al floema. Por otro lado, *Agallia excavata* y *A. modesta* pertenecen a la subfamilia Deltocephalinae, cuyos miembros se alimentan preferentemente del floema (Zahniser y Dietrich, 2008) y, debido a este hábito alimenticio, podrían ser capaces de transmitir virus. Tal es el caso de *Dalbulus maidis*, vector de *Maize rayado fino virus* (MRFV) causante de una de las enfermedades más importantes que afecta maíz en América Latina (Nault *et al.*, 1980). Dentro del género *Agallia* existen especies como *A. constricta* y *A. cuadripundata* que son vectores confirmados de la variante Nueva Jersey del *Potato yellow dwarf virus* (Rhabdoviridae) y *Wound tumor virus* (Reoviridae) en el este de los Estados Unidos (Belatra *et al.*, 2017).

(Rojas, 2009). To date, no viruses are reported to be transmitted by species of this subfamily. Dietrich (2013) mentions that the members of the Typhlocybinæ subfamily prefer to eat parenchyma cells, which suggests that there is low or no probability that they acquired begomovirus that are limited to the phloem. On the other hand, *Agallia excavata* and *A. modesta* belong to the Deltocephalinae subfamily, whose members prefer phloem (Zahniser and Dietrich, 2008) and, given this habit, would be able to transmit viruses. Such is the case of *Dalbulus maidis*, vector of *Maize rayado fino virus* (MRFV) that causes one of the most important diseases affecting maize in Latin America (Nault *et al.*, 1980). Within the *Agallia* genus there are species such as *A. constricta* and *A. cuadripundata*, which are confirmed vectors of the New Jersey variant of *Potato yellow dwarf virus* (Rhabdoviridae) and *Wound tumor virus* (Reoviridae) in eastern United States (Belatra *et al.*, 2017).

Although little is known about the interactions that cause geminivirus-vector specificity, several studies indicate that the coat protein is responsible. Briddon *et al.* (1990) demonstrated that the exchange of the *African cassava mosaic virus* (ACMV) coat protein gene (transmitted by whiteflies) along with the *Beet curly top virus* (BCTV) (transmitted by leafhoppers) altered the vector's specificity and resulted in the transmission of this ACMV chimerical isolate by leafhoppers. On the other hand, Roumagnac *et al.* (2015) recently demonstrated that *Alfalfa leaf curl virus* is transmitted by *Aphis craccivora* and suggested that this virus be considered a new genus within the Geminiviridae family (and proposed it should be named *Capulavirus*), which would include different recently discovered geminiviruses that have no known vector.

Aunque se sabe poco acerca de las interacciones que conducen a la especificidad geminivirus-vector, diversos estudios señalan a la proteína de la cápside como responsable. Briddon *et al.* (1990) demostraron que el intercambio del gen de la proteína de la cápside de *African cassava mosaic virus* (ACMV) (transmitido por mosca blanca) con el *Beet curly top virus* (BCTV) (transmitido por chicharritas), alteró la especificidad del vector dando como resultado la transmisión de este aislado químico de ACMV por chicharritas. Por otro lado, recientemente Roumagnac *et al.* (2015) demostraron la transmisión de *Alfalfa leaf curl virus* por *Aphis craccivora* y sugieren que este virus sea considerado en un nuevo género dentro de la familia Geminiviridae (nombre propuesto *Capulavirus*), que incluiría geminivirus divergentes descubiertos recientemente que no tienen un vector conocido.

En el presente estudio no se detectaron begomovirus en los individuos de *B. tabaci* analizados (No. acceso MG675920). Sin embargo, esta especie se encuentra constituida por múltiples “biotipos” que difieren en su grado de competencia como vector, número y tipo de endosimbiontes y composición genética (Brown *et al.*, 1995). Diversos estudios indican que al menos dos mecanismos diferentes pueden explicar la no transmisibilidad de los begomovirus por moscas blancas: (1) las partículas pierden su capacidad de penetrar en el epitelio intestinal del insecto; (2) los viriones pueden alcanzar la hemolinfa del insecto, pero no pueden asociarse correctamente con la proteína GroEL (Rosell *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2000). Asimismo, se ha demostrado que ciertos aislamientos de *Abutilon mosaic virus* (AbMV) no son transmitidos por *B. tabaci* (Wu *et al.*, 1996; Höfer *et al.*, 1997). En este caso, las células epiteliales del intestino de *B. tabaci* constituyen la primera barrera que los begomovirus deben cruzar para ser transmitidos y es probable que estos aislamientos de AbMV hayan

In this study no begomoviruses were detected in the *B. tabaci* individuals analyzed (Access No. MG675920). However, this species is made up of multiple “biotypes” that differ in their level of competence as a vector, the number and type of endosymbionts, and their genetic composition (Brown *et al.*, 1995). Several studies indicate that at least two different mechanisms can explain the fact that begomoviruses are not transmitted by whiteflies: (1) the particles lose their capacity to penetrate the insect’s intestinal epithelium; (2) the virions can reach the insect’s hemolymph, but they cannot become correctly associated with the GroEL protein (Rosell *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2000). Also, it has been demonstrated that certain *Abutilon mosaic virus* (AbMV) isolates are not transmitted by *B. tabaci* (Wu *et al.*, 1996; Höfer *et al.*, 1997). In this case, the epithelial cells in the intestine of *B. tabaci* are the first barrier that begomovirus must cross in order to be transmitted, and it is probable that those AbMV isolates have lost their capacity to join the receptors within the whitefly’s digestive tract (Morin *et al.*, 2000).

It was demonstrated that *Trypanalebra maculata*, *Kunzeana scimetara*, *Agallia excavata* and *Agallia modesta* collected from roselle plants and weeds associated with yellowing, vein clearing and mosaic are carriers of three begomoviruses.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for granting the scholarship that allowed the first author to obtain her M.Sc. degree, and Dr. James N. Zahniser, national expert on Heteroptera, USDA-APHIS-PPQ-NIS of the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, for the taxonomical identification of the leafhoppers included in the present study.

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

perdido la capacidad de unirse a los receptores dentro del tracto digestivo de la mosca blanca (Morin, *et al.*, 2000).

Se comprobó que *Trypanalebra maculata*, *Kunzeana scimetara*, *Agallia. excavata* y *Agallia modesta* colectadas en plantas de jamaica y maleza asociada con síntomas de amarillamiento, aclaramiento de nervaduras y mosaico son portadoras de tres begomovirus.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca para la realización de los estudios de maestría de la primera autora.

Al Dr. James N. Zahniser, especialista nacional de Heteroptera, USDA-APHIS-PPQ-NIS del National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC por la identificación taxonómica de los cicadélidos estudiados en el presente trabajo.

#### LITERATURA CITADA

- Acosta KI, Zamora L, Piñol B, Quiñones ML, Ramos PL, Luis M, Leyva LNE and Arocha Y. 2017. *Empoasca papayae* Oman, 1937 (Hemiptera: Cicadellidae) the simultaneous vector of phytoplasmas and rickettsia associated with "Bunchy Top Symptom" in Cuba. *Anales de Biología* 39:35-42. Disponible en línea: [https://www.um.es/anales-debiologia/numeros/39/PDF/39\\_2017\\_03.pdf](https://www.um.es/anales-debiologia/numeros/39/PDF/39_2017_03.pdf)
- Belatra O, Boukraa H, Loukche H and Benmessaoud BH. 2017. Potential leafhopper vectors of plant pathogens potato in the high plateaus Algerians (Hemiptera: Cicadomorpha: Auchenorrhyncha). *Advances in Environmental Biology* 11:52-56. Disponible en línea: <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/aeb/aeb/2017/January/52-55.pdf>
- Bridson RW, Pinner MS, Stanley J and Markham PG. 1990. Geminivirus coat protein replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85-94. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004268229090462Z>
- Brown JK, Frohlich DR and Rosell RC. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annual Review of Entomology* 40:511-534. Disponible en línea: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.en.40.010195.002455>
- Brown JK, Idris AM, Rogan D, Hussein MH and Palmieri M. 2001. *Melon chlorotic leaf curl virus*, a new begomovirus associated with *Bemisia tabaci* infestations in Guatemala. *Plant Disease* 85:1027. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.9.1027C>
- Brunt A, Crabtree AK, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L and Zurcher EJ. 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Disponible en línea: [http://sdb.im.ac.cn/vide/famly082.htm#Hibiscus sabdariffa](http://sdb.im.ac.cn/vide/famly082.htm#Hibiscus%20sabdarriffa)
- Chatterjee A, Roy A and Ghosh SK. 2008. Acquisition, transmission and host range of a begomovirus associated with yellow vein mosaic disease of mesta (*Hibiscus cannabinus* and *Hibiscus sabdariffa*). *Australasian Plant Pathology* 37:511-519. Disponible en línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1071%2FAP08049.pdf>
- Dietrich CH. 2013. South American leafhoppers of the tribe Typhlocybini (Hemiptera: Cicadellidae: Typhlocybinae). *Zoologia* 30:519-568. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702013000500008>
- Hague SQ and Parasram S. 1973. *Empoasca stevensi*, a new vector of bunchy top disease of papaya. *Plant Disease Reporter* 57:412-413. Disponible en línea: <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015001262768;view=1up;seq=436>
- Höfer P, Bedford ID, Markham PG, Jeske H and Frischmuth T. 1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* 236:288-295. Disponible en línea: [https://ac.els-cdn.com/S0042682297987511/1-s2.0-S0042682297987511-main.pdf?\\_tid=9630256c-fbbd-11e7-a7d8-00000aacb362&acdnat=1516217915\\_b778550a58d8ea340439c09687ff1cf](https://ac.els-cdn.com/S0042682297987511/1-s2.0-S0042682297987511-main.pdf?_tid=9630256c-fbbd-11e7-a7d8-00000aacb362&acdnat=1516217915_b778550a58d8ea340439c09687ff1cf)
- Markham PG, Bedford ID, Liu S and Pinner M. 1994. The transmission of geminiviruses by *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science* 42:123-128. DOI: 10.1002/ps.2780420209
- Moffat AS. 1999. Geminiviruses emerge as serious rop threat. *Science* 286:1835. DOI:10.1126/science.286.5446.1835
- Morin S, Ghanim M, Sobol I, and Czosnek H. 2000. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology* 276:404-416. DOI: 10.1006/viro.2000.0549
- Nault LR, Gingery RE and Gordon DT. 1980. Leafhopper transmission and host range of maize rayado fino virus. *Phytopathology* 70:709-712. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n08\\_709.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n08_709.PDF)
- Ortega AC, Ochoa MDL, Hernández MJ y Ramírez RS. 2017. Identificación de malezas hospedantes de *Okra yellow mosaic Mexico virus* y determinación de su transmisión por semilla. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México.
- Pérez TBC, Aragón GA, Bautista MN, Tapia RAM y López OJF. 2009. Entomofauna asociada al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en el municipio de Chiautla de Tapia, Puebla. *Acta Zoológica Mexicana* 25:239-247. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/575/57513245001.pdf>
- Rojas MRI. 2009. Insect vectors of phytoplasmas *In: Tropical Biology and Conservation Management - Volume 7: Phytopathology and Entomology*. Eolss Publishers Co Ltd., Oxford, United Kingdom. Disponible en línea: <https://www.eolss.net/sample-chapters/C20/E6-142-TPE-10.pdf>
- Roumagnac P, Granier M, Bernardo P, Deshoux M, Ferdinand R, Galzi S, Fernandez E, Julian C, Abt I, Filloux D, Mes-



- léard F, Varsani A, Blanc S, Martin DP and Mesléard F. 2015. *Alfalfa leaf curl virus*: An aphid-transmitted geminivirus. *Journal of Virology* 89:9683-9688. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00453-15>
- Rosell RC, TorresJI and Brown JK. 1999. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology* 89:239-246. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.3.239>
- Sambrook J and Rusell D. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Disponible en línea: <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>
- SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2015. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx) (Consulta, noviembre 2017).
- Stephan D, Siddiqua M, Hoang AT, Engelmann J, Winter S and Maiss E. 2008. Complete nucleotide sequence and experimental host range of Okra mosaic virus. *Virus Genes* 36:231-240. DOI: 10.1007/s11262-007-0181-1
- Stewart C, Kon T, Rojas M, Graham A, Martin D, Gilbertson R and Roye M. 2014. The molecular characterisation of a Sida-infecting begomovirus from Jamaica. *Archives of Virology* 159:375-378. DOI: 10.1007/s00705-013-1814-4
- Varsani A, Navas CJ, Moriones E, Hernández ZC, Idris A, Brown JK, Murilo ZF and Martin DP. 2014. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Archives of Virology* 159:2193-2203. DOI: 10.1007/s00705-014-2050-2
- Varsani A, Shepherd DN, Dent K, Monjane AL, Rybicki EP and Martin DP. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal* 6:36. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-36>
- Velázquez FP, Zamora MEJ, Ochoa MDL, Negrete FG y Hernández MJ. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:200-207. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1602-1>
- Wu ZC, Hu JS, Polston JE, Ullman DE and Hiebert E. 1996. Complete nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of Abutilon mosaic geminivirus in Hawaii. *Phytopathology* 86:608-613. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n06\\_608.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n06_608.pdf)
- Wyatt SD and Brown JK. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1293. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n12\\_1288.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n12_1288.PDF)
- Zahniser JN and Dietrich CH. 2008. Phylogeny of the leafhopper subfamily Deltocephalinae (Insecta: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) and related subfamilies based on morphology. *Systematics and Biodiversity* 6:1-24. DOI: 10.1017/S1477200007002617



# Diagrammatic scale for quantification of rust severity in teak leaves

## Escala diagramática para cuantificación de la severidad de la roya en hojas de teca

**Leila Cristiane-Delmadi\***, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Rua São Jorge, 586 - Casa 04, Bairro Cavahada, CP. 78200-000, Cáceres, Mato Grosso, Brasil; **Cristiane de Pieri, Alex Sander-Porcena, Edson Luiz-Furtado**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento de Produção Vegetal, CP. 18610-307, Botucatu, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondencia: leila.delmadi@unemat.br.

**Recibido:** 23 de Agosto, 2017.

**Aceptado:** 26 de Abril, 2018.

Cristiane-Delmadi L, Cristiane de Pieri, Sander-Porcena A, Luiz-Furtado E. 2018. Diagrammatic scale for quantification of rust severity in take leaves. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 331-341.  
**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1708-5

Primera publicación DOI: 04 de Mayo, 2018.  
First DOI publication: May 04, 2018.

**Resumen.** La roya de la teca (*Tectona grandis*), causada pelo fungo *Olivea tectonae*, se ha presentado en varias regiones de Brasil en casos graves que conducen a la caída prematura de las hojas e incluso la muerte de la planta. Sin embargo, todavía no existe un método estándar para la evaluación de la severidad de la enfermedad en el campo. El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar una escala diagramática para cuantificar la severidad de la roya en hojas de teca. La escala diagramática se desarrolló en función de la severidad de la enfermedad que abarca 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80% del área foliar con síntomas de roya. La escala fue validada por 10 evaluadores, que analizaron 50 hojas

**Abstract.** Teak (*Tectona grandis*) rust, caused by the fungus *Olivea tectonae*, has been present in several regions of Brazil in severe cases that lead to the premature fall of the leaves and even the death of the plant. However, there is still no standard method for assessment of disease severity in the field. The objective of this study was to develop and validate a diagrammatic scale to quantify the rust severity in leaves of teak. The diagrammatic scale was developed based on disease severity encompassing 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80% of the leaf area with rust symptom. The scale was validated by 10 raters, who analyzed 50 leaves with a range of disease severity, without and with diagrammatic scale as an assessment aid. The raters presented differences in the perception of the severity levels of the disease. With the adoption of the diagrammatic scale all the raters improved the accuracy of the estimates, there was a reduction in the absolute errors and good estimates of repeatability. The proposed diagrammatic scale is suitable for the evaluation of the rust severity in teak leaves, being able to provide accuracy and repeatability of estimates.

con un rango de severidad de la enfermedad, sin y con escala diagramática como ayuda de evaluación. Los evaluadores presentaron diferencias en la percepción de los niveles de severidad de la enfermedad. Con la adopción de la escala diagramática todos los evaluadores mejoraron la precisión de las estimaciones, hubo reducción en los errores absolutos y buenas estimaciones de repetitividad. La escala diagramática propuesta es adecuada para la evaluación de la severidad de la roya en las hojas de teca, siendo capaz de proporcionar precisión y repetitividad de las estimativas.

**Palabras clave:** *Tectona grandis*, *Olivea tectonae*, evaluación de enfermedad.

El sector forestal brasileño tiene un gran potencial de crecimiento, por menor costo, ciclo de producción, mayor productividad, y las variables menos activas a las fluctuaciones en el mercado financiero. Brasil resume las ventajas competitivas con respecto a otros países en el sector forestal, debido a sus favorables condiciones naturales, avances científicos y al espíritu empresarial, lo que resulta en un alto potencial de crecimiento (AMATA, 2009; ABRAF, 2013). Una especie que se ha destacado en el sector forestal, especialmente en el mercado exterior es la teca (*Tectona grandis*), originaria de la India, Myanmar, Tailandia y Laos. Es una especie de clima tropical húmedo, con lluvias de verano e invierno seco. En Brasil la teca se desarrolla mejor en zonas con precipitación media anual entre 1250 y 2500 mm y con temperatura media de 24 °C. Un periodo seco de tres a cinco meses favorece la calidad de la madera (Cáceres Florestal, 1997; EMBRAPA, 2007).

Varios estudios indican que la teca ha presentado patologías en las plantaciones internacionales y en Brasil. Estas enfermedades preocupan a

**Key words:** *Tectona grandis*, *Olivea tectonae*, disease assessment.

The Brazilian forestry sector has a great potential for growth due to lower costs, production cycles, a higher productivity, and the variables that are less active to fluctuations in the finance market. Brazil has all competitive advantages of other countries in the forestry sector, due to its favorable natural conditions, scientific advances, and the entrepreneurial spirit, which results in a high growth potential (AMATA, 2009; ABRAF, 2013). A species that has stood out in the forestry sector, and particularly in the foreign market, is the teak (*Tectona grandis*), originally from India, Myanmar, Thailand and Laos. It is species that flourishes in humid tropical climates with summer rains and dry winters. In Brazil, the teak grows best in areas with average annual rainfalls ranging between 1250 and 2500 mm and with an average temperature of 24 °C. A dry period of three to five months favors the quality of the wood (Cáceres Florestal, 1997; EMBRAPA, 2007).

Various studies indicate that the teak has presented pathologies in Brazilian and international plantations. These diseases worry producers of this crop throughout the country, particularly, teak rust, given its aggressiveness (Pieri *et al.*, 2011). The disease presents yellow and powdery-looking pustules on the surface of the underside, and a premature defoliation takes place in all phenological phases of the culture, reducing the speed of growth of the plant, causing a reduction of the photosynthetic rate, and consequently impacting the rate of wood production (Arguedas-Gamboa, 2004).

This disease was first reported in the American continent in Panama, in November 2003; later, in Costa Rica in January 2004 (Arguedas-Gamboa,

productores de este cultivo en todo el país, en especial la roya de la teca, dada su agresividad (Pieri *et al.*, 2011). La enfermedad presenta pústulas de color amarillo y de aspecto polvoso en la superficie del envés, y se produce una defolia prematura en todas las fases fenológicas de la cultura, reduciendo la velocidad de crecimiento de las plantas, ocasionando reducción de la tasa fotosintética y consecuentemente influenciando en la producción de madera (Arguedas-Gamboa, 2004).

En el continente Americano, esta enfermedad fue reportada por primera vez en Panamá en noviembre de 2003, posteriormente en Costa Rica en enero de 2004 (Arguedas-Gamboa, 2004), en Ecuador en septiembre y en México en diciembre 2005 (NAPPO, 2005). En 2005 se registró en Colombia (Céspedes y Yepes, 2007) y en 2006 en Cuba (Pérez *et al.*, 2008). El primer reporte de esta enfermedad en Brasil fue en 2009 y posteriormente fue constatada en varios municipios de diferentes estados brasileños (Pieri *et al.*, 2011).

Los métodos adecuados para la evaluación de la enfermedad deben permitir un mayor grado de exactitud, precisión y repetitividad, por lo que tales métodos varían según el agente causal de la enfermedad (Berger, 1980). La severidad es la variable utilizada en el caso de enfermedades foliares y la cuantificación de esta variable es crucial para dar subsidios a diversas acciones en la agricultura, como los estudios epidemiológicos, evaluar las estrategias de control, seleccionar genotipos resistentes y realizar pruebas con productos agroquímicos (Campbell y Madden, 1990). La evaluación de la severidad se lleva a cabo normalmente de manera subjetiva por medio de análisis visuales, por lo tanto, la escala diagramática se ha convertido en una herramienta importante en estos estudios (Kranz, 1988; Nutter Jr. *et al.*, 2006). Las escalas se usan en la normalización de la estimación visual, por lo que la evaluación es más precisa

2004); in Ecuador in September, and in Mexico in December 2005 (NAPPO, 2005). In 2005, it was reported in Colombia (Céspedes and Yepes, 2007), and in 2006, in Cuba (Pérez *et al.*, 2008). The first report of this disease in Brazil took place in 2009 and was later verified in several municipal areas of different Brazilian states (Pieri *et al.*, 2011).

The appropriate methods for the evaluation of the disease must allow a greater degree of accuracy, precision and repetitiveness, therefore such methods vary depending on the causal agents of the disease (Berger, 1980). Severity is the variable used in the case of foliar diseases and the quantification of this variable is crucial for subsidizing different actions in agriculture, such as epidemiological studies, evaluations of control strategies, selecting resistant genotypes and carrying out tests with agrochemical products (Campbell and Madden, 1990). The evaluation of severity is normally carried out in a subjective manner through visual analyses, and therefore the diagrammatic scales have become an important tool in these studies (Kranz, 1988; Nutter Jr. *et al.*, 2006). Scales are used in the normalization of the visual estimation; therefore, the evaluation is more precise and accurate between evaluators and it reduces errors in visual estimations (Campbell and Madden, 1990).

Some of the most important characteristics in a diagrammatic scale are the ease of use, applicability in the face of a large variety of conditions with reproducible results, and the existence of intervals that represent all the stages of development of the disease (Berger, 1980; Bergamin Filho and Amorim, 1996).

Proposing a standardized system to orient the evaluation of the severity of a particular disease is an important responsibility, since, if the system is deficient, the cost of its use may be higher than the benefits obtained with its use (Leite and Amorim, 2002; Nutter Jr. and Schultz, 1995). However,

y exacta entre los evaluadores y reduce el error en la estimación visual (Campbell y Madden, 1990).

Entre las características más importantes en una escala diagramática se encuentran: facilidad de uso, aplicabilidad ante una amplia gama de condiciones con resultados reproducibles y la existencia de intervalos que representan todas las etapas de desarrollo de la enfermedad (Berger, 1980; Bergamin Filho y Amorim, 1996).

La propuesta de establecer un sistema estandarizado para orientar la evaluación de la severidad de una determinada enfermedad es de gran responsabilidad, pues, si el sistema es deficiente, el costo de su utilización puede ser mayor que los beneficios alcanzados con su uso (Leite y Amorim, 2002; Nutter Jr. y Schultz, 1995). Sin embargo, la estandarización es altamente deseable, pues la uniformización de la metodología de evaluación de enfermedades permite comparaciones entre los resultados obtenidos en diferentes instituciones y localidades (Bergamin Filho y Amorim, 1996).

Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo el desarrollo y la validación de una escala diagramática para cuantificar la roya de teca en campo.

Para la realización de este trabajo, se utilizaron 200 hojas adultas de teca colectadas en la plantación experimental en la Hacienda Lageado - UNESP/FCA (Botucatu, São Paulo, Brasil) con 10 años de edad y en la empresa Tropical Flora (Garça, São Paulo, Brasil), las cuales presentaban diferentes niveles de daño por la roya; además, de hojas sanas.

Posteriormente las hojas fueron escaneadas para análisis y preparación de la escala. Cada hoja se evaluó de acuerdo a la relación de área enferma y la severidad real de la enfermedad en porcentaje. El área afectada y área foliar sana fueron determinadas en RGB (rojo, verde, azul) con base en la metodología utilizada por Masson *et al.* (2008). Posteriormente, los niveles intermedios de la escala de severidad se determinaron de acuerdo con la ley

a standardization of the disease evaluation methodology is highly desirable, since it helps compare results obtained in different institutions and locations (Bergamin Filho and Amorim, 1996).

The aim of this study, therefore, was to develop and validate a diagrammatic scale to quantify teak rust in the field.

In order to do this, 200 adult teak leaves, aged 10 years, were gathered in an experimental field in the Hacienda Lageado - UNESP/FCA (Botucatu, São Paulo, Brasil) in the Tropical Flora company (Garça, São Paulo, Brasil), all of which presented different levels of damage due to rust; they were collected along with healthy leaves.

Each leaf was evaluated according to the proportion of the diseased area and the real severity of the disease, as a percentage. The healthy and affected areas were determined in RGB (red, green, blue) based on the methodology described by Masson *et al.* (2008). Later, the intermediate levels of the scale of severity were determined according to the Weber-Fechner law (Horsfall and Barratt, 1945).

The scale was validated by 10 evaluators, who analyzed 50 digital images of adult teak leaves, both healthy and with symptoms of rust at different levels of severity. The evaluators had different levels of experience, some with previous knowledge of a scale, and others without experience or knowledge.

Each image of a leaf was projected for the evaluators using Power Point for 30 seconds in two stages: the first observation was performed without the use of a diagrammatic scale; the evaluators carried out the evaluation by placing a value, expressed as a percentage, in a previously established format. In the second stage, the evaluators received a new format along with the diagrammatic scale for reference. The images of the 50 teak leaves were projected for their evaluation against the scale.



de la agudeza visual de Weber-Fechner (Horsfall y Barratt, 1945).

La validación de la escala se realizó por 10 evaluadores que analizaron 50 imágenes digitales de hojas adultas de teca, sanas y con síntomas de roya en diferentes niveles de severidad. Los evaluadores presentaban diferentes niveles de experiencia, algunos con conocimiento previo de una escala y otros sin experiencia y desconocimiento.

Cada imagen de una hoja fue proyectada a los evaluadores a través del programa Power Point, por 30 segundos en dos etapas: la primera observación se realizó sin el uso de la escala diagramática, los evaluadores realizaron la evaluación colocando un valor expresado en porcentaje en un formato previamente establecido. En la segunda etapa, los evaluadores recibieron un nuevo formato junto con la escala diagramática para su referencia, nuevamente se proyectaron las imágenes de las 50 hojas de teca para ser evaluadas con respecto a la escala.

Con la información obtenida de las evaluaciones con y sin escala se determinó la precisión de las estimaciones obtenidas mediante el cálculo del coeficiente de determinación de exactitud y la varianza de los errores absolutos. Se realizó un análisis por regresión lineal simple, teniendo en cuenta la severidad real como la variable independiente y la estimada como variable dependiente. La precisión de las estimaciones se evaluó mediante el coeficiente de determinación o precisión ( $r^2$ ) y la varianza de los errores absolutos (severidad estimada menos real) (Kranz, 1988; Nutter Jr. *et al.*, 1993).

La escala diagramática de la roya de la teca presenta siete niveles de severidad en función de la distribución de la muestra: N0 = 0% (sin síntomas o signos); N1 = 2,5%; N2 = 5%; N3 = 10%; N4 = 20%; N5 = 40%; N6 = 80%, de manera exponencial, de acuerdo con la ley de Weber-Fechner como se muestra en la Figura 1.

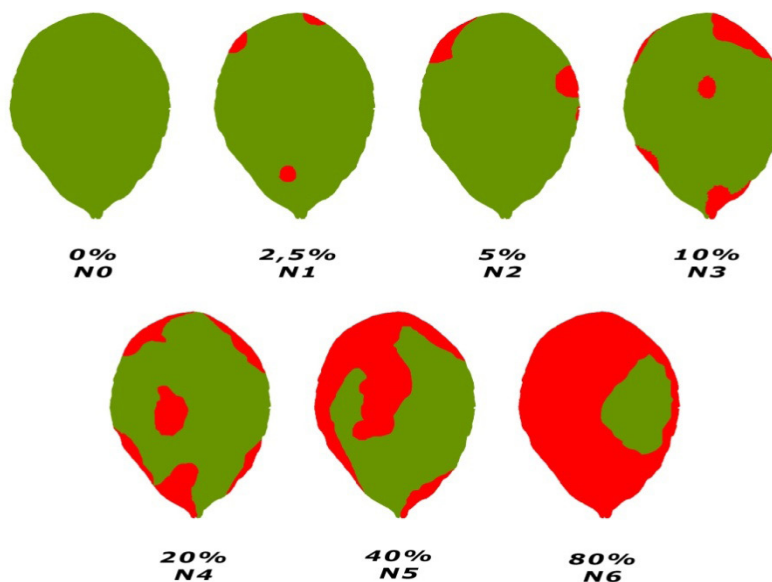
Using the information obtained from the evaluations with and without scales, we determined the precision of the estimations obtained by calculating the coefficient of determination of the accuracy and the variance of absolute errors. A simple linear regression analysis was carried out, considering the real severity as the independent variable and the estimated severity, as the dependent variable. The precision of the estimations was evaluated using the precision or determination coefficient ( $r^2$ ) and the variance of the absolute errors (estimated severity minus real severity) (Kranz, 1988; Nutter Jr. *et al.*, 1993).

The diagrammatic scale of teak rust presented seven severity levels, based on the distribution of the sample: N0 = 0% (no symptoms or signs); N1 = 2.5%; N2 = 5%; N3 = 10%; N4 = 20%; N5 = 40%; N6 = 80%, exponentially, according to the Weber-Fechner law, as shown in Figure 1.

In the validation of the diagrammatic scale, the 10 evaluators presented differences in the perception of the severity levels of the disease. The evaluators presented a good accuracy, with and without scales, due to the estimated severity values being near the real values. Absolute errors decreased when the diagrammatic scale was used as an aid for evaluation (Figure 2).

The evaluators displayed adequate estimations for repetitiveness, which can be viewed in the results of the regression between the first and second evaluation (with and without a scale). Due to the proximity of the estimated severity values and the real intensity values, the validation obtained very promising results (Figure 2).

The severity estimated using the scale and the regression lines obtained between the actual value and the estimation (continuous line) of rust in adult teak leaves are shown in Figure 2. The intercept (a) and slope coefficients (b) and determination  $r^2$ ,



Escala diagramática para quantificação da severidade de *Oliveae neotectonae* em *Tectona grandis* L. (TECA).  
Valores em percentagem de área foliar com es sintomas.

Figura 1. Escala diagramática para la evaluación de la severidad de la roya de la teca causada por el hongo *Oliveae tectonae*. Valores en porcentaje de área foliar con síntomas.

Figure 1. Diagrammatic scale for the evaluation of the severity of teak rust cause by the fungus *Oliveae tectonae*. Values in percentages of leaf area with symptoms.

En la validación de la escala diagramática, los 10 evaluadores presentaron diferencias en la percepción de los niveles de severidad de la enfermedad. Los evaluadores presentaron buena precisión, con y sin escala, debido a que los valores de severidad estimados estaban cerca de los valores reales. Hubo una reducción en los errores absolutos cuando se utilizó la escala diagramática como una ayuda para la evaluación (Figura 2).

Los evaluadores mostraron buenas estimaciones de repetitividad, que se pueden ver en los resultados de la regresión entre la primera y la segunda evaluación (con y sin escala). Debido a la proximidad de los valores de severidad estimados a los valores de la intensidad real, la validación obtuvo resultados muy prometedores (Figura 2).

obtained in the regressions between the real and the estimated, with and without the use of a diagram, are shown in Table 1.

There was a reduction in the absolute errors when the diagrammatic scale was used as an aid for evaluation (Figure 2).

With the adoption of the diagrammatic scale proposed, all evaluators improved the precision of the estimations ( $r^2=0.93$ ) in comparison with the result obtained without the use of the scale ( $r^2=0.88$ ).

Similar values between the estimated and real valued determine the accuracy of the evaluations. Precision is a factor to consider in the validation of a diagram scale, and it is defined as the precision or fan operation that supposed rigor and accuracy.

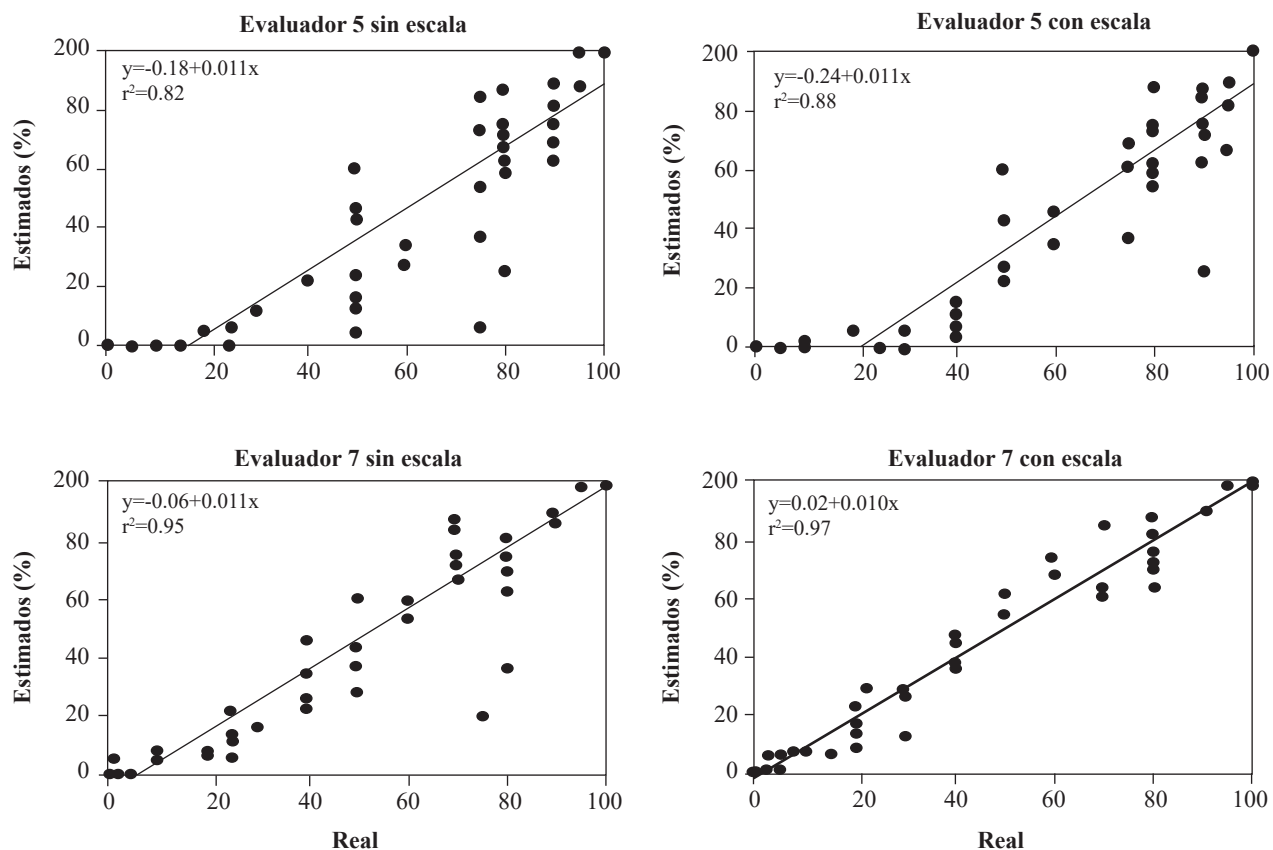


Figura 2. Validación estadística de la escala diagramática para evaluar la severidad de la roya de la teca. Los evaluadores 5 y 7 fueron seleccionados para representar el análisis de regresión lineal entre la severidad real y la estimada con y sin usar la escala diagramática. Esos evaluadores tenían la precisión más baja y más alta ( $r^2$ ), respectivamente.

Figure 2. Statistical validation of the diagrammatic scale to assess teak rust severity. Evaluators 5 and 7 were selected to represent the linear regression analysis between actual and estimated severity with and without using the diagrammatic scale. Those evaluators had the lowest and highest precision ( $r^2$ ), respectively.

La severidad estimada con la ayuda de la escala y las líneas de regresión obtenidas entre el valor actual y el estimado (línea continua) a la roya en las hojas adultas de la teca se muestran en la Figura 2. Los coeficientes angulares (a), lineales (b) y de determinación  $r^2$ , obtenidos en las regresiones entre lo real y el estimado, con y sin el uso de diagrama se presentan en el Cuadro 1.

Hubo una reducción en los errores absolutos cuando se utilizó la escala diagramática como una ayuda para la evaluación (Figura 2).

Con la adopción de la escala diagramática propuesta, todos los evaluadores mejoraron la precisión

Precision can be evaluated by determining the coefficient of regression analysis, which must be near to 1, and by the variation of absolute error (difference between estimated and real severity) (Bergamin Filho and Amorim, 1996).

The difference between evaluators in the quantification of teak rust confirms observations by Nutter Jr. and Schultz (1995) regarding the variation in the ability between individuals to discriminate disease levels. The quality of the disease estimation is not only influenced by stimuli and psychological answers but can also be affected by factors such as the complexity of the sampling unit, size and

**Cuadro 1.** Intercepción (a), pendiente (b) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenidos de una regresión lineal simple entre valores reales y estimaciones de severidad de roya de la teca realizados por diez evaluadores mediante el uso, y sin uso, de la escala diagramática.

**Table 1.** Intercept (a), slope (b) and determination coefficient ( $r^2$ ) obtained with simple linear regression between real values and estimations of teak rust severity for ten evaluators with and without using the diagrammatic scale.

| Escala | Coeficientes | Evaluadores |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |
|--------|--------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
|        |              | 01          | 02   | 03   | 04   | 05   | 06   | 07   | 08   | 09   | 10   | Media |
| Sin    | a            | 0.01        | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01  |
|        | b            | 0.05        | 0.12 | 0.07 | 0.04 | 0.18 | 0.11 | 0.06 | 0.07 | 0.01 | 0.17 | 0.09  |
|        | $r^2$        | 0.89        | 0.87 | 0.87 | 0.86 | 0.82 | 0.92 | 0.95 | 0.87 | 0.91 | 0.86 | 0.88  |
| Con    | a            | 0.01        | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01  |
|        | b            | 0.04        | 0.11 | 0.02 | 0.03 | 0.24 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.09 | 0.06  |
|        | $r^2$        | 0.93        | 0.91 | 0.93 | 0.93 | 0.88 | 0.97 | 0.97 | 0.93 | 0.94 | 0.92 | 0.93  |

de las estimaciones ( $r^2=0.93$ ) en comparación con el resultado obtenido sin el uso de la escala ( $r^2=0.88$ ).

Valores similares entre los valores estimados y los reales determinan la exactitud de las evaluaciones. La precisión es un factor a considerar en la validación de una escala diagrama, y se define como la precisión de una operación que suponga el rigor y la exactitud. La precisión se puede evaluar mediante la determinación del coeficiente de análisis de regresión, que debe estar cerca de 1, y por la variación de error absoluto (diferencia entre la severidad estimada y real) (Bergamin Filho y Amorim, 1996).

La diferencia entre los evaluadores en la cuantificación de la roya de la teca confirma las observaciones de Nutter Jr. y Schultz (1995) en cuanto a la variación en la habilidad entre individuos para discriminar niveles de enfermedad. La calidad de la estimación de la enfermedad, además de ser influenciada por estímulos y respuestas psicológicas, puede ser afectada por factores como la complejidad de la unidad de muestreo, tamaño y forma de las lesiones, color y número de lesiones en la unidad de muestreo (Kranz, 1988), fatiga y dificultad concentración en la tarea (Shokes *et al.*, 1987).

La mejora en la precisión de las estimaciones de la severidad de la roya en hojas de teca con la utilización de la escala diagramática se asemeja a

shapes of the lesions, color and number of lesions in the sampling unit (Kranz, 1988), fatigue and difficulty of concentration on the task (Shokes *et al.*, 1987).

The improvement in the accuracy of the estimations of the severity of rust in teak leaves with the use of the diagrammatic scale is similar to the results obtained in several studies carried out earlier, involving other pathosystems (Del Ponte *et al.*, 2017).

Even without the use of the diagrammatic scale, evaluators presented good levels of accuracy in the estimations, similar to the one confirmed in the validation of diagrammatic scales for rust in coffee (Capucho *et al.*, 2011), sugarcane (Klosowski *et al.*, 2013), bean (Godoy *et al.*, 1997), soybean (Godoy *et al.*, 2006) and grapevine (Angelotti *et al.*, 2008), and may be a result of the ease of evaluation of the severity of the disease, due to the size of the rust pustules on leaves.

The evaluators presented certain levels of absolute errors in the estimations, even with the use of the diagrammatic scale. However, according to statements by Stonehouse (1994), the presence of some level of error in the evaluations may be compensated by the speed and standardization that result from the use of diagrammatic scales. Likewise, as in most disease severity quantification



los resultados obtenidos en varios estudios realizados previamente involucrando otros patosistemas (Del Ponte *et al.*, 2017).

Incluso sin la utilización de la escala diagramática los evaluadores presentaron buena precisión en las estimaciones, que se asemeja al constatado en la validación de escalas diagramáticas para royas en café (Capucho *et al.*, 2011), caña de azúcar (Klowski *et al.*, 2013), frijol (Godoy *et al.*, 1997), soya (Godoy *et al.*, 2006) y vid (Angelotti *et al.*, 2008), y pueden ser resultado de la facilidad de evaluación de la severidad de la enfermedad debido al tamaño de las pústulas de roya en las hojas.

Los evaluadores presentaron determinados niveles de errores absolutos en las estimaciones incluso con la utilización de la escala diagramática. Sin embargo, Conforme a lo destacado por Stonehouse (1994), la presencia de algún nivel de error absoluto en las evaluaciones puede ser compensado por la rapidez y estandarización que resultan del uso de escalas diagramáticas. Además, como la mayoría de los métodos de cuantificación de severidad de enfermedades, el uso de escalas diagramáticas está sujeto a cierto grado de subjetividad, lo que puede ser minimizado con el entrenamiento de los evaluadores (Nutter Jr. y Schultz, 1995; Nutter *et al.*, 2006).

La mejora en la repetitividad de las estimaciones de severidad de la enfermedad, como obtenida en este estudio con la utilización de la escala diagramática, es una característica importante en el desarrollo de métodos estándar de evaluación de enfermedades, pues indica que evaluaciones realizadas en diferentes momentos por un mismo evaluador presenta elevada precisión (Campbell y Madden, 1990).

La escala diagramática propuesta y validada en este estudio atiende a varios ítems listados en reciente artículo (Del Ponte *et al.*, 2017) sobre las mejores prácticas para la conducción de desarrollo

methods, the use of diagrammatic scales is subjected to a certain degree of subjectivity, which can be minimized by training the evaluators (Nutter Jr. and Schultz, 1995; Nutter *et al.*, 2006).

The improvement in the repeatability of the disease severity estimations, as obtained in this study with the use of the diagrammatic scale, is important in developing standard disease evaluation methods, since it indicates that evaluations performed in different moments by a same evaluator presents a higher level of accuracy (Campbell and Madden, 1990).

The diagrammatic scale proposed and validated in this study serves various items listed in a recent article (Del Ponte *et al.*, 2017) on the best practices for conducting and validating diagrammatic scales to quantify plant diseases.

## CONCLUSIONS

The diagrammatic scale proposed is adequate for the evaluation of the severity of rust in teak leaves, since it is able to provide accuracy and repeatability of the estimations. This standard procedure may be highly valuable for applying in field surveys, in epidemiological Studies, and the evaluation of disease control measures.

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

y validación de escalas diagramáticas para cuantificación de enfermedades de plantas.

CONCLUSIONES

La escala diagramática propuesta es adecuada para la evaluación de la severidad de la roya en las

hojas de teca, siendo capaz de proporcionar precisión y repetitividad das estimativas. Este procedimiento estándar puede ser de gran valor para la aplicación en las encuestas de campo, en los estudios epidemiológicos y en la evaluación de las medidas de control de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- ABRAF, Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. 2013. Anuário estatístico da ABRAF 2013 - Ano base 2012. Disponible en línea: <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-abraf13-br.pdf> (consulta, agosto 2017).
- AMATA. 2009. Mercado de bosques plantados. São Paulo, Brasil. Disponible en línea: www.amatabrasil.com.br/download-arquivo?id=588 (consulta, julio 2017).
- Angelotti F, Scapin CR, Tessmann DJ, Vida JB, Oliveira RR and Canteri MG. 2008. Diagrammatic scale for assessment of grapevine rust. *Tropical Plant Pathology* 33:439-443. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000600006>
- Arguedas-Gamboa M. 2004. La roya de la teca *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia en Panamá y Costa Rica. *Revista Forestal* 1:1-16. Disponible en línea: <http://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/600/2818>
- Bergamin Filho A y Amorim L. 1996. Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico. *Agrônômica Ceres*. São Paulo, Brasil. 299p.
- Berger RD. 1980. Measuring disease intensity. Pp: 28-31. *In: Teng PS and Krupa SV* (eds.). *Crop Loss Assessment Which Constrain Production and Crop Improvement in Agriculture and Forestry*. University of Minnesota Press. St. Paul, USA. 269p.
- Cáceres Florestal. 1997. Manual do cultivo da teca. Disponible en línea: http://www.caceresflorestal.com.br/Manual_do_cultivo_da_teca-Caceres_Florestal.pdf (consulta, mayo 2017).
- Campbell CL and Madden LV. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons. New York, USA. 532p. <https://doi.org/10.1017/S0007485300051890>
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS and Vaz GRO. 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* 60:1144-1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x>
- Céspedes PB y Yepes MS. 2007. Nuevos registros de royas (uredinales) potencialmente importantes en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín* 60:3645-3655. DOI: 10.15446/rfnam
- Del Ponte EM, Pethybridge SJ, Bock CH, Michereff SJ, Machado FJ and Spolti P. 2017. Standard area diagrams for aiding severity estimation: scientometrics, pathosystems and methodological trends in the last 25 years. *Phytopathology* 107:1161-1174. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0069-FI>
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2007. Sistema de produção de teca para o Estado de Rondônia. Disponible en línea: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/698944/1/spteca.pdf> (Consulta, febrero 2016).
- Godoy CV, Carneiro SMTGP, Iamauti MT, Pria MD, Amorim L, Berger RD and Bergamin Filho A. 1997. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. *Journal of Plant Disease and Protection* 104:336-345. <https://pdfs.semanticscholar.org/525b/8b3e232bd5781f9b4f670c98e5f376779d2e.pdf>
- Godoy CV, Koga LJ and Canteri MG. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:63-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000100011>
- Klosowski AC, Ruaro L, Besspalhok Filho JC y May De Mio LL. 2013. Proposta e validação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology* 38:166-171. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013000200012>
- Kranz J. 1988. Measuring plant disease. Pp: 35-50. *In: Kranz J and Rotem J* (eds.). *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology*. Springer-Verlag. Heidelberg: Germany. 299p.
- Leite RMVBC y Amorim L. 2002. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. *Summa Phytopathologica* 28:14-19.
- Horsfall JC and Barratt RW. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology* 35:665.
- NAPPO, North American Plant Protection Organization. 2005. Pest Alert - Detección de la roya de la teca (*Olivea tectonae*), (Rac.) Thirum. Chaconiaceae, en el municipio de Las Choapas, Veracruz, México. Disponible en línea: <http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=142&keyword=Olivea%20tectonae> (consulta, febrero 2016).
- Nutter Jr. FW, Esker PD and Coelho Netto RA. 2006. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology* 115:95-103. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Nutter Jr. FW and Schultz PM. 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17:174-184. <https://doi.org/10.1080/07060669509500709>
- Nutter Jr. FW, Gleason ML, Jenco JH and Christians NC. 1993. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology* 83:806-812. DOI: 10.1094/Phyto-83-806
- Pérez M, López MO and Marti O. 2008. *Olivea tectonae*, leaf rust of teak, occurs in Cuba. *New Diseases Reports* 17:32. Disponible en línea: <http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=017032>
- Pieri C, Passador MM, Furtado EL y Carvalho Júnior AA. 2011. Ferrugem da teca (*Olivea neotectonae*): novas ocorrências no Brasil e revisão do nome específico. *Summa Phytopathologica* 37:199-201. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052011000400006>

Shokes FM, Berger RD, Smith DH, Rasp JM. 1987. Reliability of disease assessment procedures: a case study with late leafspot of peanut. *Oléagineux* 42:245-251.

Stonehouse J. 1994. Assessment of Andean bean diseases using visual keys. *Plant Pathology* 43:519-527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb01586.x>

First Report of *Colletotrichum* spp. in fruits of allspice (*Pimenta dioica*) in Veracruz, Mexico

Primer reporte del género *Colletotrichum* spp. en frutos de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) en Veracruz, México

Aidé Velázquez-Silva, Silvia Edith García-Díaz, Departamento de Ingeniería Forestal, División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; Leticia Robles-Yerena*, Cristian Nava-Díaz, Daniel Nieto-Ángel, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México. *Autor para correspondencia: pagin03@yahoo.com.mx.

Recibido: 03 de Noviembre, 2017.

Aceptado: 29 de Abril, 2018.

Velázquez-Silva A, García-Díaz SE, Robles-Yerena L, Nava-Díaz C, Nieto-Ángel D. 2018. First Report of *Colletotrichum* spp. in fruits of allspice (*Pimenta dioica*) in Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 342-355.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-1

Primera publicación DOI: 05 de Mayo, 2018.

First DOI publication: May 05, 2018.

Resumen. La pimienta gorda se ha visto afectada por antracnosis, enfermedad que ataca frutos provocando manchas marrón-oscuras hundidas, hasta necrosar los frutos. Entre 2015-2016 en el norte de Veracruz se colectaron frutos de pimienta gorda con y sin síntomas de antracnosis, de estos se obtuvieron 13 cultivos monospóricos; posteriormente fueron caracterizados morfológica, patogénica y molecularmente. Para la caracterización morfológica los aislados se sembraron en medio de papa dextrosa agar y descritos mediante 11 variables. Para la caracterización patogénica fueron inoculados en frutos de pimienta gorda de tres localidades,

Abstract. Allspice is being affected by anthracnose, a disease that attacks fruits, causing dark brown-dark spots, until necrosis invades the fruits and causes them to fall. Between 2015 and 2016 in the north of Veracruz, allspice fruits were collected with and without symptoms of anthracnose. Isolates were obtained, for a total of 13 monosporic isolates, which were submitted to morphological, pathogenic and molecular characterization. For the morphological characterization, the isolates were seeded in potato dextrose agar media and described by 11 variables. In the pathogenic characterization, the isolates were inoculated on fruits of three locations, with and without injury prior to inoculation; the controls were inoculated with sterile distilled water. For the molecular characterization, the deoxyribonucleic acid was extracted by the CTAB extraction and purification method. The ITS region was amplified with primers ITS4, ITS5. All isolates were pathogenic in fruits after 11 days of inoculation. Morphological characterization identified two species: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*. Molecularly, the results of the morphological

con y sin herida previa a la inoculación, los testigos fueron tratados con agua destilada estéril. Se evaluó la incidencia y severidad. Para la caracterización molecular se extrajo el ácido desoxirribonucleico por el método de extracción y purificación CTAB. La región del ITS fue amplificada con los primers ITS4, ITS5. La caracterización morfológica identificó dos especies: *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Todos los aislados resultaron patogénicos en los frutos después de 11 días de la inoculación. Molecularmente se confirmaron los resultados de la identificación morfológica y de dos especies adicionales: *C. fragariae* y *C. boninense*.

Palabras clave: especia, antracnosis, caracterización morfológica, patogénica y molecular.

La pimienta gorda es una planta utilizada en el arte culinario, es producida en regiones tropicales en la zona costera del Golfo de México. Más de 15 mil toneladas de pimienta gorda por año se producen en municipios de la Sierra del Totonacapan, estas son distribuidas a nivel nacional y a países de la Unión Europea. Actualmente la producción es afectada por hongos que atacan follaje, tallo, flor y principalmente los frutos de esta planta, lo que ha contribuido en la pérdida de la calidad en el producto, por lo que se investigan las causas que ocasionan dicha reducción (Carballo PI. 2016, abril 10).

La antracnosis es una enfermedad que afecta especies vegetales de diferentes familias botánicas de zonas calurosas y húmedas, causada por diferentes especies del género *Colletotrichum*. Los síntomas comunes que este patógeno provoca son: manchas hundidas de color café oscuro, en hojas, tallos, flores o frutos, dando lugar a la muerte de los tejidos (Rivera, 2007).

En agosto del 2014, la M. C. Silvia E. García Díaz (Comunicación personal), realizó un diagnos-

identification and of two additional species were confirmed: *C. fragariae* and *C. boninense*.

Key words: spice, anthracnose, morphological, pathogenic and molecular characterization.

Allspice is a plant used in the culinary arts and it is produced in tropical areas of the coastal areas of the Gulf of Mexico. More than 15 thousand tons of allspice are produced in municipal areas of the Sierra del Totonacapan and distributed nationwide, as well as to countries in the European Union. Its production is currently being affected by fungi that attack leaves, stem, flowers, and mainly the flowers of this plant, which has contributed to the loss in quality of the product, and has lead to investigations on the cause of such reduction (Carballo PI. 2016, abril 10).

Anthracnose is a disease that affects plant species of different botanical families from hot and humid areas, caused by different species of the genus *Colletotrichum*. The symptoms commonly caused by this pathogen are dark brown concave spots on leaves, stems, flowers or fruits, leading to the death of tissues (Rivera, 2007).

In August of 2014, M. C. Silvia E. García Díaz (personal communication) performed a diagnosis on allspice fruits, stems and leaves with material from the field in Northern Veracruz, and found symptoms of anthracnose; the disease caused losses of 20 to 50% of the production in pre and post harvest. Due to a lack of information on this fungus in the host, this investigation was carried out between 2015 and 2016, in order to detect the presence of the pathogen with certainty. Because of this, the aim of our investigation was to characterize, pathogenically and molecularly, different isolations obtained from allspice fruits (*Pimenta dioica* L. Merrill) with symptoms of anthracnose and determine the causal agent.

tico en frutos, tallos y hojas de pimienta gorda con material procedente de campo de la zona norte de Veracruz, se detectaron síntomas de antracnosis enfermedad que causo pérdidas del 20 hasta el 50% de la producción en pre y postcosecha. Al no contar con información de este hongo en el hospedante se realizó el presente trabajo entre el 2015-2016, para detectar con certeza la presencia del patógeno. Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar morfológica, patogénica y molecularmente diferentes aislados obtenidos de frutos de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L. Merrill) con síntomas de antracnosis y determinar el agente causal.

El muestreo y colecta de material vegetal (hojas, tallos y frutos) con síntomas de antracnosis se realizó en tres huertos intercalados de pimienta gorda y cultivos básicos, ubicados al norte de Veracruz (Localidad 1: La Fábrica, Coxquihui (20.177222°/-97.560278°); Localidad 2: Chapultepec, Espinal (20.204444°/-97.545000°) y Localidad 3: Sta. Isabel, Espinal (20.191111°/-97.529722°)). De cada huerto se colectaron tres muestras, una por cada árbol seleccionado en base a la presencia de síntomas, el estado fenológico de los árboles fue etapa de fructificación. El primer experimento se realizó en julio del 2015 y el segundo en agosto de 2016 (época de producción), en el laboratorio de Enfermedades de Postcosecha del Instituto de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. De cada sitio de colecta, se seleccionaron frutos con síntomas de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 1 min, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, se colocaron en cámaras húmedas a 25 ± 1 °C por cinco días. Al observar signos del patógeno en la superficie de los frutos, se realizaron preparaciones y se confirmó el hongo de interés. De estos se obtuvieron cultivos monospóricos en medio de cultivo PDA (39 gr en 1L agua) siguiendo la metodología

The sampling and collection of plant material (leaves, stems and fruits) with symptoms of anthracnose was carried out in three orchards alternated with allspice and basic crops, located in Northern Veracruz (Location 1: La Fábrica, Coxquihui (20.177222°/-97.560278°); Location 2: Chapultepec, Espinal (20.204444°/-97.545000°) and Location 3: Sta. Isabel, Espinal (20.191111°/-97.529722°)). Three samples were taken from each orchard, one for each tree chosen, based on the presence of symptoms, and the phenological state of the trees was the stage of fructification. The first experiment was carried out in July of 2015, and the second one, in August of 2016 (production season), in the Postharvest Diseases Laboratory of the Instituto de Fitosanidad-Fitopatología of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. From each collection site, fruits were collected with symptoms of the disease, disinfected with sodium hypochlorite at 1% for 1 min, washed using sterile distilled water, and dried with sterile paper towels. Later, they were placed in humidity chambers at 25 ± 1 °C for five days. After finding signs of the pathogen on the surface of the fruits, preparations were made and the fungus of interest was confirmed. From these, we obtained monospore cultures in a PDA culture medium (39 gr in 1L water), following the dilution and dispersion method (Echandi, 1971). Each monospore culture developed in the culture medium for seven days. For the morphology, discs were taken from those cultures, each 0.5 cm in diameter, four repetitions were planted per isolation in Petri dishes with a PDA medium (Bioxon), they were incubated at 28 °C and their growth was evaluated every 48 h until the pathogen filled the dish. The following macroscopic variables were recorded after 10 days: 1) Growth in diameter; 2) Margin of the colony; 3) Type of mycelia; 4) Color of colony; 5) Concentric growth rings; 6) Sporulated colony. After each isolation, preparations were made to

de dilución y rayado (Echandi, 1971). Cada cultivo monospórico se desarrolló en medio de cultivo durante siete días. Para la morfología se extrajeron discos de 0.5 cm de diámetro de esas colonias y se sembraron cuatro repeticiones por aislado en cajas de Petri con medio PDA (Bioxon), se incubaron a 28 °C y se evaluó el crecimiento cada 48 h hasta que el patógeno llenara la caja. Se registraron las siguientes variables macroscópicas evaluadas a los 10 días: 1) Crecimiento en diámetro; 2) Margen de la colonia; 3) Tipo de micelio; 4) Color de colonia; 5) Anillos concéntricos de crecimiento; 6) Colonia esporulada. Posteriormente de cada aislamiento se realizaron preparaciones para caracterizar a las microvariables. Las variables microscópicas evaluadas fueron: 7) Tipo de conidio; 8) Estado sexual; 9) Color y dimensión de apresorio, para observar estas características se utilizó un microscopio compuesto (Micro Star, American Optical) con objetivo 40x; 10) Dimensiones de 50 conidios por aislado; y 11) Dimensiones de 50 apresorios. Los apresorios se obtuvieron a los cinco días de poner preparaciones de conidios en cámaras húmedas para inducir su formación. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y los datos fueron analizados de dos formas: 1) aplicando un análisis multivariado por clusters para las variables empleadas en la identificación y así obtener un dendograma de agrupamiento de las características morfológicas para conocer las especies involucradas en el desarrollo de síntomas de antracnosis en pimienta gorda; 2) se realizó un análisis de varianza normal donde se compararon diámetros de colonias de seis días. Los análisis matemáticos se realizaron utilizando el paquete de análisis estadístico SAS® System for Windows V9, 2002. La identificación de los aislados de *Colletotrichum* en frutos de pimienta gorda se basó en las variables morfológicas, morfométricas, así también en el agrupamiento obtenido del análisis multivariado comparado con

characterize the microvariables. The microscopic variables evaluated were: 7) Type of conidia; 8) Sexual stage; 9) Color and dimension of appressoria, using a compound microscope (Micro Star, American Optical) with a 40x lens to observe these characteristics; 10) Dimensions of 50 conidia per isolation; and 11) Dimensions of 50 appressoria. The appressoria were obtained after 5 days of preparing conidia in humidity chambers to induce their formation. A total random experimental design was used and the data were analyzed in two ways: 1) applying a multivariate analysis by clusters for the variables used in the identification, thus obtaining a clustering dendrogram of the morphological characteristics to know which species were involved in the development of symptoms of anthracnose in allspice; 2) a normal analysis of variance was carried out, in which the diameters of six day old colonies were compared. Mathematical analyses were carried out using the statistical analysis package SAS® System for Windows V9, 2002. The identification of the *Colletotrichum* isolations in allspice fruits was based on the morphological and morphometric, as well as the clustering obtained from the multivariate analysis compared with the descriptions and keys by (Bailey *et al.*, 1996; Barnett y Hunter, 1998). To verify that the symptoms observed in the fruits gathered in the field were caused by the isolations obtained, Koch's postulates (Agrios, 2002). Healthy fruits were gathered (approximately 300 allspice fruits) and 13 *Colletotrichum* spp. monospore isolations obtained from allspice. In order to increase the inoculant, the isolations were planted in corn meal agar (CMA). Using the developed spores, a mother solution was prepared, and the concentration was determined using a hemocytometer, adjusted to 1×10^6 spores/mL. The fruits were disinfected using sodium hypochlorite (NaClO) at 1% for 1 min and rinsed twice with

las descripciones y claves de (Bailey *et al.*, 1996; Barnett y Hunter, 1998).

Para corroborar que los síntomas observados en los frutos colectados en campo, fueron ocasionados por los aislados obtenidos, se realizaron los postulados de Koch (Agrios, 2002). Se colectaron frutos sanos (aproximadamente 300 frutos de pimienta gorda) en los sitios de muestreo y se utilizaron 13 aislados monospóricos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de pimienta gorda. Para incrementar el inoculo, los aislados fueron sembrados en medio de cultivo harina de Maíz (AHM), con las esporas desarrolladas se preparó una solución madre, la concentración se determinó con un Hematocitómetro y se ajustó a 1×10^6 esporas/mL. Los frutos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por 1 min y enjuagados dos veces con agua destilada estéril, se dejaron secar durante 15 min; se colocaron en cajas de Petri y estas en cámaras húmedas. La inoculación de los frutos se realizó con la suspensión de esporas; para dos aislados que no presentaron esporulación se utilizaron discos de 0.5 cm de diámetro que contenían micelio. Se colocaron 5 μ L de la suspensión de conidios sobre frutos sin herida (s/h) y con herida (c/h) realizada con una aguja de disección a una profundidad de 1 mm; en los testigos se aplicaron 5 μ L de agua destilada estéril en frutos s/h y c/h, por sitio de muestreo. Las cámaras húmedas fueron selladas e incubadas a 23 ± 1 °C, con luz natural durante 11 días. Para evaluar la patogenicidad se determinó la presencia o ausencia de manchas necróticas circulares o deformes, el porcentaje de incidencia y la severidad del hongo sobre el fruto. La incidencia se evaluó como porcentaje de frutos afectados por el patógeno. Para el análisis se agruparon los datos c/h y s/h por aislado y por localidad, utilizando la siguiente ecuación (1), sugerida por Anculle y Álvarez (1999). La severidad se evaluó como porcentaje de tejido afectado por el patógeno, utilizando la escala visual de Anculle y Alvarez (2006), modificada

sterile distilled water and left to dry for 15 min. They were then placed in Petri dishes that were, in turn, placed in humidity chambers. Fruit inoculation was carried out with the spore suspension; for two isolation that displayed sporulation, we used discs, 0.5 cm in diameter, which contained mycelium. We placed 5 μ L of the conidia suspension on fruits without lesions (w/o/l) and with lesions (w/l), made with a dissection needle, to a depth of 1 mm. In the controls, 5 μ L of distilled water were applied in fruits w/o/l and w/l, per sampling site. The humidity chambers were sealed and incubated at 23 ± 1 °C, with natural light for 11 days. To evaluate the pathogenicity, we determined the presence or absence of circular or deformed necrotic spots, the percentage of incidence, and the severity of the fungus on the fruit. Incidence was evaluated as a percentage of fruits affected by the pathogen. For the analysis, the data of w/o/l and w/l were grouped by isolation and location, using equation (1), suggested by Anculle and Álvarez (1999). Severity was evaluated as the percentage of tissue affected by the pathogen, using the visual scale by Anculle and Alvarez (2006), modified and adapted to the experiment; considering the degree of the condition graded visually in each fruit, it was valued using severity equation 2 according to Anculle and Alvarez (1999).

$$\text{Incidencia (I)} = \left(\frac{\text{No. de frutos enfermos}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (1)$$

$$\text{Severidad (S)} = \left(\frac{\text{No. de frutos en cada grado}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (2)$$

The treatments were a combination of isolations, inoculation and host method, established under a

y adaptada al experimento; teniendo en cuenta el grado de afección calificado visualmente en cada fruto, fue valorada con la ecuación 2 de severidad según Anculle y Alvarez (1999).

$$\text{Incidencia (I)} = \left(\frac{\text{No. de frutos enfermos}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (1)$$

$$\text{Severidad (S)} = \left(\frac{\text{No. de frutos en cada grado}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (2)$$

Los tratamientos fueron una combinación de aislado, método de inoculación y hospedante, establecido bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones inoculados con herida (c/h) y cinco sin herida (s/h) comparando el grado del daño sobre el fruto, el aislado y el sitio de muestreo para la variable severidad; para la variable incidencia se utilizó un análisis multivariado comparando el número de frutos dañados c/h y s/h, los aislados y la incidencia en los tres sitios de muestreo. Los análisis matemáticos se llevaron a cabo usando el paquete de análisis estadístico SAS® System for Windows V9, 2002. Para la confirmación de los postulados de Koch, se reaisló el patógeno extrayendo fragmentos de tejido y/o esporulación, que fueron depositados en PDA, se observaron y compararon las variables macro y microscópicas de los reaislados con las que presentaron los originales de los frutos de pimienta gorda. El experimento se repitió dos veces.

Cultivos monospóricos de los 13 aislamientos fueron incubados por 10 días a temperatura ambiente 23 ± 1 °C en medio de cultivo PDA. De cada aislado se tomó una muestra de micelio, se depositó en un tubo Eppendorf para ser macerado.

total random design with five repetitions inoculated with a lesion (w/w) and five without a lesion (w/o/l), comparing the degree of damage on the fruit, the isolation and the sampling site for the variable of severity; for the variable of incidence, we used a multivariate analysis comparing the number of damaged fruits w/l and w/o/l, the isolations and the incidence on the three sampling sites. Mathematical analyses were performed using the statistical analysis package SAS® System for Windows V9, 2002. To confirm Koch's postulates, we reisolated the pathogen, extracting fragments of tissue and/or sporulation, which were deposited in PDA, observed and we compared the macro and microscopic variables of the reisolations with which the original allspice fruits were presented. The experiment was carried out twice.

Monospore cultures from all 13 isolations were incubated for 10 days at a room temperature of 23 ± 1 °C in a PDA culture medium. A sample of mycelium was taken from each isolation and deposited into an Eppendorf tube to be macerated. DNA was extracted with the CTAB extraction and purification method (Wagner et al., 1987). Later, DNA concentration was quantified using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). We completely amplified genes ITS-1, ITS-2 and 5.8S, and partially, gene 18S and 28S of the 13 *Colletotrichum* spp. isolations; primers ITS 5 and ITS 4 were used. The PCR amplification and sequencing (ITS) of the DNA extracted were carried out using the Sanger method in the company Macrogen (Korea). The sequences of the 13 isolations were compared with those deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), with the support of the Blast tool. The sequences with the greatest similarities were extracted from the data bank for phylogenetic analyses and then, along with those obtained from the fruits, they were aligned (Clustal W)

La extracción de ADN se realizó por el método de extracción y purificación CTAB (Wagner *et al.*, 1987). Posteriormente de cada muestra se cuantifico la concentración de ADN mediante un Nano-Drop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Se amplificaron completamente los genes ITS-1, ITS-2 y 5.8S; y parcialmente al gen 18S y 28S de los 13 aislados de *Colletotrichum* spp.; se utilizaron los primers ITS 5 e ITS 4. La amplificación PCR y la secuenciación (ITS) del ADN extraído se llevó a cabo con el método de Sanger en la empresa Macrogen (Korea). Las secuencias de los 13 aislados fueron comparadas con las depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), con apoyo de la herramienta Blast. Las secuencias de mayor similitud fueron extraídas del banco de datos para los análisis filogenéticos y posteriormente junto con las obtenidas de los frutos fueron alineadas (Clustal W) y después procesadas mediante el método UPGMA en el programa Mega 6 (Análisis de Genética Evolutiva Molecular), para la obtención de un análisis filogenético.

Se obtuvieron 13 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. de los cuales se identificaron cuatro especies aislados de frutos de pimienta gorda con síntomas de antracnosis (Figura 1). El crecimiento en diámetro fue similar para la mayoría de los aislados, excepto para tres con crecimiento lento, identificados como *C. acutatum*. El 69% de las colonias presentaron un crecimiento y margen circular, mientras que el 31% un crecimiento circular y un margen ondulado, pero la mayoría presentó anillos concéntricos. Andrades *et al.* (2009) y Chowdappa *et al.* (2012), describieron colonias con márgenes regulares y un crecimiento circular; Morales *et al.* (2009) y Saldarriaga *et al.* (2008), observaron formación de anillos de crecimiento en algunos de sus aislados. Por otra parte, el 15% de los aislados presentó un micelio aéreo y el 54% fue plano; el 8% micelio denso y el 23% fue escaso;

and processed using the UPGMA method in the program Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), to obtain a phylogenetic analysis.

Thirteen *Colletotrichum* spp. monospore cultures were obtained, out of which four isolated allspice fruit species were identified as presenting symptoms of anthracnosis (Figure 1). The growth in diameter was similar for most isolations, except for three with a slow growth, identified as *C. acutatum*. Out of all the cultures, 69% presented a circular growth and edge, while 31% presented a circular growth and a wavy edge, although most presented concentric rings. Andrades *et al.* (2009) and Chowdappa *et al.* (2012), described cultures with regular edges and a circular growth; Morales *et al.* (2009) and Saldarriaga *et al.* (2008), observed a formation of growth rings in some of their isolations. On the other hand, 15% of the isolations presented aerial mycelia and 54% was flat; 8% presented a dense mycelium and in 23%, it was scarce fue escaso. Similar results were presented by Saldarriaga *et al.* (2008), since 70% of their strains presented a thin, superficial growth, mycelial aggregates. The color of the culture was initially white-salmon, and later turned dark gray; 54% had a salmon-white-gray, 31% was white-gray, 8% was salmon and 7% were white cultures; similar percentages were reported by Dominguez *et al.* (2012). On the other hand, Freeman *et al.* (1998), report that *C. acutatum* developed salmon-colored conidial masses, and *C. gloeosporioides*, a gray sporulation. Out of the isolations, 77% produced unicellular hyaline conidia with rounded edges and only 23% presented conidia with one rounded edge, and another acute edge; Villanueva *et al.* (2008), reported the formation of hyaline, aceptados, cyllindrical and straight. Robles (2015) mentioned that 83% of his isolations developed unicellular, hyaline conidia with rounded edges, 11% presented conidia with one rounded edge and another acute

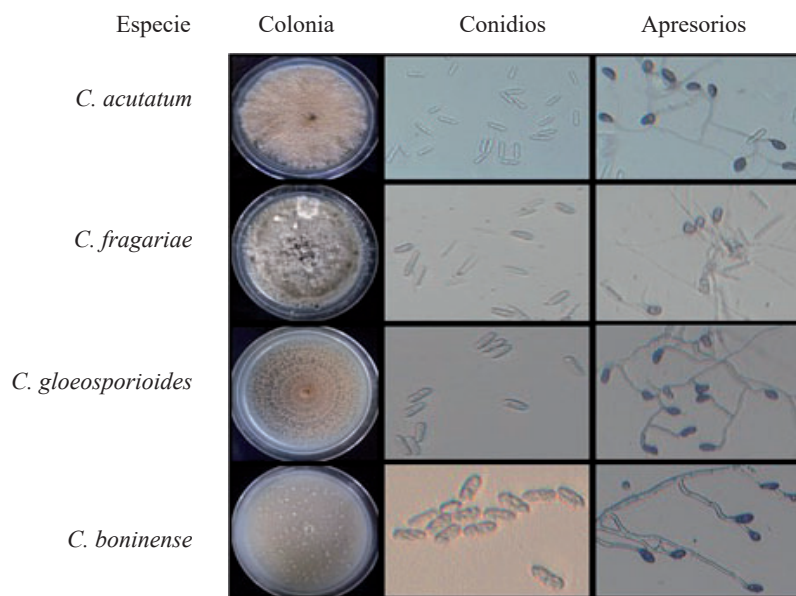


Figura 1. Características macroscópicas y algunas microscópicas de las especies de *Colletotrichum* spp., obtenidos de frutos de pimienta gorda en el norte de Veracruz.

Figure 1. Macroscopic and some microscopic characteristics of the *Colletotrichum* spp. species obtained from allspice fruits in Northern Veracruz.

resultados parecidos fueron reportados por Saldarriaga *et al.* (2008) el 70% de sus cepas presento crecimiento ralo superficial, agregados miceliales. El color de colonia inicialmente fue blanca-salmón, posteriormente se tornó gris oscuro; el 54% presentó una coloración salmón-blanco-gris, el 31% blanco-gris, el 8% salmón y el 7% colonias blancas, porcentajes similares fueron reportados por Dominguez *et al.* (2012). Por su parte, Freeman *et al.* (1998), reportan que *C. acutatum* desarrollo masas conidiales de color salmón y *C. gloeosporioides* una esporulación grisácea. El 77% de los aislados produjo conidios unicelulares, hialinos, con extremos redondeados y solo el 23% presentó conidios con un extremo redondeado y el otro agudo; Villanueva *et al.* (2008), reportaron la formación de conidios hialinos, aceptados, cilíndricos y rectos. Robles (2015), mencionó que el 83% de sus aislados desarrollaron conidios unicelulares, hialinos, con extremos redondeados, el 11% presentó conidios

edge, and 6% of conidia with both ends being acute. Villanueva *et al.* (2008), reported that the *C. gloeosporioides* conidia presented obtuse ends, but some are narrow, and *C. Fragariae*, and obtuse end and another narrow end. The length and width of the conidia ranged between 18.1 - 44.9 μm and 4.2 - 13.6 μm , respectively; the total average for the size of conidia was 28.4 x 8.4 μm . Statistically, no significant differences were found in the length and width ($\text{Pr}>\text{F}$: <0.0001; α : 0.05; LSD length and width of conidium: 1.2891 and 0.4377). Similar results were reported by Villanueva *et al.* (2008). Irregular appressoria were observed, with different shapes, and with a dark brown color. Length ranged between 9.2 and 90.2 μm , while the width ranged between 5.9 and 57.1 μm ; the average was 25.9 x 15.5 μm ; statistically, no significant differences were found in length ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0014, α : 0.05, LSD: 6.0527) and width ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0001, α : 0.05, LSD: 3.4877). Robles (2015) and Oliveira *et al.* (2005)

con un extremo redondeado y el otro agudo y el 6% conidios con ambos extremos agudos. Villanueva *et al.* (2008), reportó que los conidios de *C. gloeosporioides* presentaron extremos obtusos pero algunos angostos y en *C. fragariae* un extremo obtuso y otro angosto. La longitud y ancho de los conidios osciló entre 18.1 - 44.9 μm y 4.2 - 13.6 μm , respectivamente; el promedio total en tamaño de conidios fue de 28.4 x 8.4 μm ; estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en la longitud y ancho ($\text{Pr}>\text{F}$: <0.0001; α : 0.05; LSD largo y ancho de conidio: 1.2891 y 0.4377). Resultados similares fueron reportados por Villanueva *et al.* (2008). Se observaron apresorios irregulares, de formas diferentes, de color café oscuro; la longitud osciló de 9.2 - 90.2 μm mientras el ancho de 5.9 - 57.1 μm ; el promedio fue de 25.9 x 15.5 μm ; estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en la longitud ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0014, α : 0.05, LSD: 6.0527) y ancho ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0001, α : 0.05, LSD: 3.4877). Robles (2015) y Oliveira *et al.* (2005) reportaron resultados similares a los obtenidos en este experimento; Villanueva *et al.* (2008), observaron que los apresorios formados por *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. orbiculare* fueron de color café, forma y tamaño similar; *C. boninense* promueve apresorios solitarios o en cadenas cortas, color marrón, de paredes gruesas, borde entero o crenado, rara vez lobulados, de forma irregular comúnmente en forma de proyectil de 4.5-18 x 4-11 μm de acuerdo a Damm *et al.* (2012). Solo un aislado presentó ascas con ascosporas hialinas, ligeramente curvadas y con los vértices redondeados; los demás sin presencia; Robles (2015), reporta una escasa formación de peritecios en medio de cultivo PDA. Con los datos obtenidos de las 11 características macroscópicas y microscópicas se realizó un análisis multivariado; se encontró un eigenvalue de 2.07 a los cuatro clusters o grupos. Esta información se confirmó con el valor de la Pseudo F que alcanzó un punto máximo de 21.9 a los cuatro grupos o clusters. Con estos

reported similar results to those obtained in this experiment; Villanueva *et al.* (2008), observed that the appressoria formed by *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. orbiculare* were dark brown, and with similar shapes and sizes; *C. boninense* promotes appressoria in short chains or solitary, brown-colored, with thick walls, whole or crenate edges, rarely lobulated, with irregular shapes, but commonly in the shape of a projectile 4.5-18 x 4-11 μm according to Damm *et al.* (2012). Only one isolation presented asci with hyaline ascospores, slightly curves and with rounded vertices, and the rest had no presence. Robles (2015), reports a scarce formation of perithecia in a PDA culture medium. A multivariate analysis was carried out using data obtained from the 11 macroscopic and microscopic characteristics, and an eigenvalue of 2.07 was found for the four clusters or groups. This information was confirmed using the value of the Pseudo F that peaked at 21.9 for the four clusters or groups. These values affirm that when analyzing the groups alongside the evaluated, the 13 isolations can be classified into four groups.

The aggressiveness of the isolations was variable in the form of inoculation (w/l and w/o /l), type of inoculation (suspension and section of growth media) and between isolations; these differences helped prove that some isolations are capable of inducing more aggressiveness than others, regardless of the condition of the inoculation. Some allspice fruits presented brown, circular necrotic spots on the epidermis of the fruit, concave, moist and soft lesions. As the infection progressed, the spots turned brownish-maroon to dark; salmon-colored, pink to orange sporulation appeared on the lesions, and in some cases, white mycelia formed from the initial lesion, until it covered the fruits. These results coincide with those reported by Somashekhara *et al.* (2013).

Incidence percentages obtained ranged from 20 to 100% from *Colletotrichum* spp. on the total

valores se asevera que al analizar paralelamente las variables evaluadas, los 13 aislados se pueden clasificar en cuatro grupos.

La agresividad de los aislados fue variable en forma de inoculación (c/h y s/h), tipo de inoculación (suspensión y bocado) y entre los aislados; estas diferencias permitieron probar que algunos aislados son capaces de inducir más agresividad que otros, independientemente de la condición de inoculación. Se observaron frutos de pimienta gorda con manchas necróticas circulares de color café sobre la epidermis del fruto, lesiones hundidas, húmedas y blandas; conforme la infección avanzó, las manchas se tornaron marrón-café a oscuras, sobre las lesiones se presentó esporulación de color salmón, rosa a naranja y en algunos casos se desarrolló micelio blanco que cubrió los frutos a partir de la lesión inicial; Estos resultados coinciden con lo reportado por Somashekhara *et al.* (2013).

Se obtuvieron porcentajes de incidencia desde 20 a 100% por *Colletotrichum* spp. sobre la totalidad de frutos; se observó mayor incidencia en frutos de la localidad 2 y esta fue menor en proporción en aquellos procedentes de la localidad 1. Bogantes y Mora (2013), reportaron una alta incidencia (70%), pero baja severidad en frutos, de papaya. En el análisis multivariado se encontró un eigenvalue de 6.32 a los 2 clusters o grupos. Esta información se confirmó al revisar el valor de la Pseudo F que alcanzó un punto máximo de 20.9 a los dos grupos mayores o clusters. Por su parte, los resultados de la evaluación de severidad mostraron que esta fue mayor en frutos de pimienta gorda de la localidad 2, y en menor proporción en las localidades 1 y 3 ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05, LSD: 6.9888$; diferencia en medias de: 35.644 A en la localidad 2 contra 5.604 B en la localidad 1) (Figura 2), así también se obtuvieron porcentajes de severidad altos en las inoculaciones, y se observó un nulo porcentaje en inoculaciones con agua ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05$;

amount of fruits. A higher incidence was observed in fruits from location 2, which was lower than in location 1. Bogantes and Mora (2013) reported a high incidence (70%) but low severity in papaya fruits. The multivariate analysis found an eigenvalue of 6.32 in two clusters or groups. This information was confirmed when reviewing the value of Pseudo F that reached a maximum point of 20.9 for the two highest clusters or groups. On the other hand, the results of the severity evaluation showed that it was higher in allspice fruits from location 2, and to a lesser extent, in locations 1 and 3 ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05, LSD: 6.9888$; difference in averages of 35.644 A in location 2 against 5.604 B in location 1) (Figure 2). In this way, high percentages for severity were also obtained in inoculations, and a null percentage was observed in inoculations with water ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05$; LSD: 13.778; difference in averages of 16.773 A for suspension against 0.000 B in inoculation with water). The severity of each isolation in fruits from location 2 was of 100% ($Pr > F: 0.0094, \alpha: 0.05$ y LSD: 20.636), invading the fruits completely, with abundant sporulation, and in some, white to gray mycelia developed. Similar results were obtained by Bogantes and Mora (2013), obtaining a percentage of 100% for papaya fruits affected by anthracnose, with an average of 36% for severity in fruits.

The reisolations obtained from the inoculated fruits displayed symptoms and signs with similar macro and micro morphological characteristics to those of the original isolations, complying with Koch's 4^o postulate in a satisfactory manner.

The ITS region of the thirteen isolations obtained from allspice fruits was amplified, and this helped compare and determine the fungus species. The results obtained from the GenBank with the Blast tool of the amplified sequences revealed that the 13 existing isolations were divided into four



Figura 2. Aislados de *Colletotrichum* spp. que causan el mayor grado de severidad en frutos de pimienta gorda.
Figure 2. *Colletotrichum* spp. isolations that cause the highest degree of severity in allspice fruits.

LSD: 13.778; diferencia en medias de: 16.773 A por suspensión contra 0.000 B en inoculación con agua). La severidad de cada aislado en frutos de la localidad 2 fue del 100% ($Pr > F$: 0.0094, α : 0.05 y LSD: 20.636), invadiendo completamente a los frutos, abundante esporulación y en algunos se desarrolló micelio de color blanco a gris. Resultados similares fueron reportados por Bogantes y Mora (2013), obteniendo un 100% de frutos de papaya afectados por antracnosis con un promedio de 36% de severidad en fruta.

Los reaislamientos que se obtuvieron de los frutos inoculados, presentaron síntomas y signos con características macro y micro morfológicas iguales a las de los aislados originales, con lo que se cumplió satisfactoriamente el 4° postulado de Koch.

La región ITS de los trece aislados obtenidos de frutos de pimienta gorda, fue amplificada permitiendo comparar y determinar las especies de hongos; los resultados obtenidos del GenBank mediante la herramienta Blast de las secuencias amplificadas de los iniciadores, revelaron que los 13 aislados existentes se dividieron en cuatro especies del género *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. boninense*. Con las

species of the genus *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. boninense*. Using the sequences, we created a phylogenetic tree (Figure 3), which shows the clustering of associates species. According to the similar characteristics of the isolations, three groups can be distinguished: the group with the highest number of isolations is composed of the species *C. gloeosporioides*, and within this set with analogous characteristics is *C. fragariae*; the second group differs by a lower proportion of the largest set and includes the species *C. boninense*; and the last group that desynchronizes molecularly and morphologically from the other isolations includes the species *C. acutatum*.

The use of molecular techniques for this investigation was of great importance, since the species belonging to this genus show a great genetic variability, which is expressed in morphological variability, virulence, and aggressiveness (Freeman *et al.*, 2000).

Thirteen monospore isolations were obtained from *Colletotrichum* spp., from allspice fruits taken from three locations. Using morphological characterizations, we identified *C. acutatum* (23%),

secuencias se obtuvo un árbol filogenético (Figura 3), en el que se observa el agrupamiento de las especies asociadas, según las características similares de los aislados, se diferencian tres grupos: el grupo con mayor número de aislados lo conforma la especie *C. gloeosporioides*, dentro de este conjunto con características análogas se encuentra *C. fragariae*; el segundo grupo difiere en menor proporción del conjunto mayor y ubica a la especie *C. boninense*; y el último grupo que se desfasa molecular y morfológicamente de los demás aislados coloca a la especie *C. acutatum*.

La utilidad de las técnicas moleculares para esta investigación fue de considerable importancia ya que las especies pertenecientes a este género muestran una gran variabilidad genética, que se expresa en variabilidad morfológica, virulencia y agresividad (Freeman *et al.*, 2000).

Se obtuvieron 13 aislados monospóricos de *Colletotrichum* spp., de frutos de pimienta gorda provenientes de tres localidades productoras. Con

a species of slow growth, with rounded and sharp edges, and *C. gloeosporioides* (77%), a pathogen of fast growth, with conidia with rounded edges; the variable of sexual state of phase was found in an isolation. In pathogenic characterization, we found a variation in the aggressiveness between *Colletotrichum* isolations on allspice fruits, finding a higher number of aggressive isolations in fruits in the location of Chapultepec, Espinal, Ver., which helped affirm that, at least for this investigation, pathogenicity does depend in the location from which the isolation is taken. Out of the two methods of inoculation (w/l and w/o/l), the best results were obtained using the method w/l, which showed a higher incidence and severity of *Colletotrichum* in the fruits; controls displayed no symptoms. Molecular identification confirmed the results of morphological characterization and showed the presence of two additional species, therefore, out of the 13 isolations, three belonged to *C. acutatum*, one belonged to the species *C. fragariae*, eight

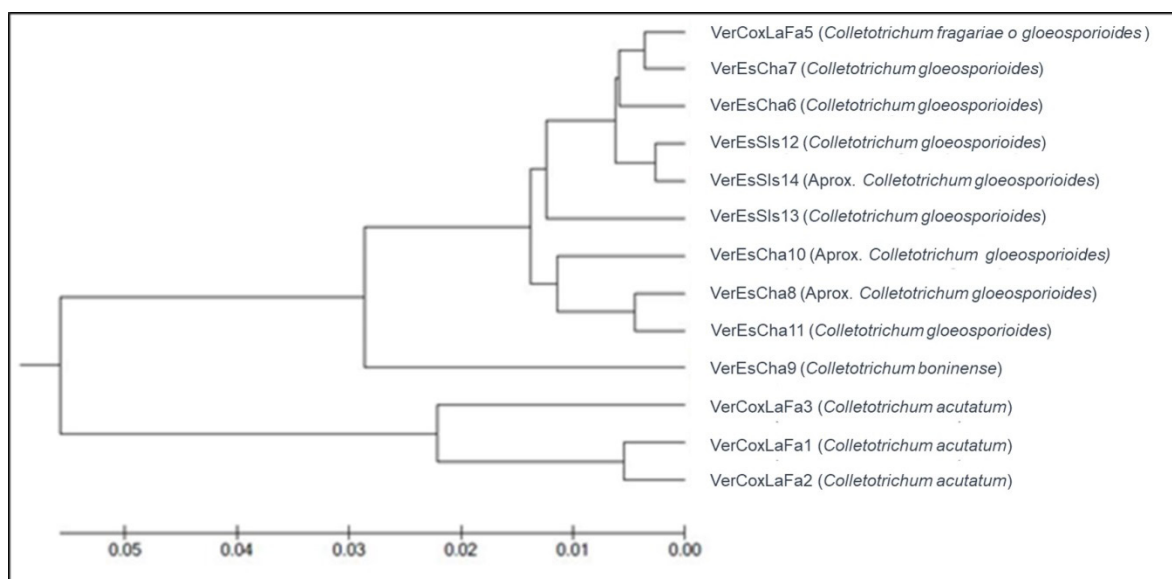


Figura 3. Árbol filogenético de los 13 aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de pimienta gorda en el norte de Veracruz.

Figure 3. Phylogenetic tree for the 13 *Colletotrichum* spp. isolations obtained from allspice fruits in Northern Veracruz.

la caracterización morfológica se identificó a *C. acutatum* (23%), especie con crecimiento lento, conidios con extremo redondeado y agudo; y *C. gloeosporioides* (77%), patógeno con crecimiento rápido, conidios con extremos redondeados; la variable estado o fase sexual se encontró en un aislado. En la caracterización patogénica se encontró variación en agresividad entre los aislados de *Colletotrichum* sobre los frutos de pimienta gorda, encontrando mayor número de aislados agresivos en frutos pertenecientes a la localidad Chapultepec, Espinal, Ver., lo que permitió aseverar que al menos para esta investigación, la patogenicidad sí depende de la localidad de donde se obtenga el aislado. De los dos métodos de inoculación (c/h y s/h) los mejores resultados se obtuvieron con el método c/h, que mostraron mayor incidencia y severidad de *Colletotrichum* en los frutos, en los testigos no se observó ningún síntoma. La identificación molecular confirmó los resultados de la caracterización morfológica y evidenció la presencia de dos especies adicionales, por lo cual de los 13 aislados: tres aislados correspondieron a *C. acutatum*; uno a la especie *C. fragariae*; ocho a la especie *C. gloeosporioides* y uno como *C. boninense*. Los resultados moleculares obtenidos coincidieron con un alto porcentaje de similitud (97 a 99%) con las especies reportadas en el GenBank, de otros hospederos.

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2002. Fitopatología. Second Edition. Limusa. México. 837p.
- Anculle A y Álvarez R. 1999. Evaluación de enfermedades de plantas. Estudio Arequipa, Perú. Disponible en línea: <https://es.scribd.com/document/151857253/Evaluacion-de-Enfermedades-de-Las-Plantas>
- Anculle A y Álvarez R. 2006. Evaluación de enfermedades de plantas. Arequipa, Perú: Senasa. Disponible en línea: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09021>
- Andrades I, Yender F and Labarc J. 2009. Evaluation of anthracnose (*Colletotrichum* sp) in *Annona muricata* L. Giant type in the sector Moralito, Zulia State, Venezuela. Revista UDO Agrícola 9:148-157. Disponible en línea: <http://udoagricola.orgfree.com/V9N1UDOAg/V9N1Andrades148.htm>
- Bailey JA, Nash C, Morgan LW, O'Connell RJ and TeBeest DO. 1996. Molecular Taxonomy of *Colletotrichum* species causing Anthracnose on the Malvaceae. Phytopathology 86:1076-1083. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-86-1076>
- Barnett H. and Hunter B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. APS Press. Minnesota, USA. 197p.
- Bogantes A y Mora N. 2013. Incidencia y Severidad de la Anthracnosis en líneas e híbridos de papaya (*Carica papaya*). Agronomía Mesoamericana 24:411-417. Disponible en línea: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S165913212013000200017&script=sci_arttext&tlng=en#Corres1
- Carballo PI. 2016. Apoya IPN a productores de pimienta de Papantla. El Diario Martinense. Disponible en línea: <http://diarioelmartinense.com.mx/estado/regional/36165-apoya-ipn-a-productores-de-pimienta-de-papantla.html>
- Chowdappa P, Somashekar C, Bharghavi R, Sandhya H and Prasad P. 2012. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. Isolates causing anthracnose of orchids in India. Biotechnology Bioinformatics Bioengineering 2:567-572. Disponible en línea: <http://bioscipub.com/journals/bbb/pdf/567-572.pdf>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP and Crous PW. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies in Mycology 73:1-36. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0002>
- Dominguez GI, Mohali CSR, Marin MMA y Pino MHB. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. Tropical Plant Pathology 37:108-122. Disponible en línea: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762012000200003&script=sci_abstract&tlng=es
- Echandi E. 1967. Obtención de cultivos monospóricos por los métodos de dilución y rayado. Pág. 16. In: Echandi E (eds.). Manual de laboratorio para Fitopatología General. Turrialva. 51p. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?id=9I0gAQAIAAJ&pg=PA16&lpg=PA16&dq=Obtenci%C3%B3n+de+cultivos+monosp%C3%B3ricos+por+los+m%C3%A9todos+de+diluci%C3%B3n+y+rayado&source=bl&ots=Q0FKvqrC7w&sig=5BjxvuFLWKYUuvmpl6aOXSnStb4&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi6opKeoMPTAhWC>

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

- Freeman S, Katan T and Shabi E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-604. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.596>
- Freeman S, Minz D, Jurkevitch E, Maymos M and Shabi E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90:608-614. <http://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.6.608>
- Morales GJL, Azpiroz RHS y Pedraza SME. 2009. Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causante de la antracnosis en aguacate (*Persea americana* Mill) en Michoacán, México. *Revista UDO Agrícola* 9:848-856. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3394147>
- Oliveira R, Moral J, Bouhmid K. y Trapero A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de sanidad vegetal* 31:531-548. Disponible en línea: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/2420>
- Rivera G. 2007. Conceptos Introductorios a la Fitopatología (1 ed.). EUNED, ed.) Costa Rica. Disponible en línea: [https://books.google.com/books?id=xpTHXEWG\\_t8C&pg=PA6&lpg=PA6&dq=Conceptos+Introductorios+a+la+Fitopatolog%C3%ADa&source=bl&ots=OQNO\\_7ozWd&sig=SjX\\_YMlwt5cJucIh8oKsQBURa34&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjlgfiAh7rLAhXq74MKHb8mBkQQ6AEIITAB#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com/books?id=xpTHXEWG_t8C&pg=PA6&lpg=PA6&dq=Conceptos+Introductorios+a+la+Fitopatolog%C3%ADa&source=bl&ots=OQNO_7ozWd&sig=SjX_YMlwt5cJucIh8oKsQBURa34&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjlgfiAh7rLAhXq74MKHb8mBkQQ6AEIITAB#v=onepage&q&f=false)
- Robles L. 2015. Caracterización morfológica, molecular, patogenicidad cruzada y Resistencia a productos químicos en aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de aguacate a nivel nacional. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. Fitosanidad-Fitopatología, Texcoco de Mora, Edo. México. Tesis Doctoral. Pp. 167.
- Saldarriaga CA, Castaño Z y Arango I. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol manzano y mora. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 32:145-156. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/257652278\\_Caracterizacion\\_del\\_Agente\\_Causal\\_de\\_la\\_Antracnosis\\_en\\_Tomate\\_de\\_Arbol\\_Manzano\\_y\\_Mora](https://www.researchgate.net/publication/257652278_Caracterizacion_del_Agente_Causal_de_la_Antracnosis_en_Tomate_de_Arbol_Manzano_y_Mora)
- Somashekhara A, Vasanthakumari M, Mahishi P, Mallikarjunaswamy G and Shivanna M. 2013. Prevalence and Severity of Anthracnose of Yam (*Dioscorea alata* and *D. bulbifera*) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Bhadra Wildlife Sanctuary in Karnataka. *Journal Mycology Plant Pathology* 43:282-290. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/256838587>
- Villanueva A, Yañez MJ y Hernandez AM, 2008. Especies de *Colletotrichum* en Chirimolla (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia* 42:689-701. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952008000600009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000600009)
- Wagner D, Furnier G, Saghay-Marroof M, Williams S, Dancik B and Allard R. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* (pp. 2097-2100). Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC304592/>

# First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico

## Primer reporte de *Cladosporium cladosporioides* causando pudriciones en frutos de zapote mante en México

**Olivia Nabor-Romero, Manuel Silva-Valenzuela, Reyna Isabel Rojas-Martínez\***, Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Interacción Planta-Patógeno-Vector. Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5, Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, México, C.P. 56230, México; **Ramón Garza-García**, Campo Experimental Valle de México. Carretera Texcoco-los Reyes-km. 13.5 Texcoco, Coatlinchan, C.P. 56250, Texcoco, México. \*Autor para correspondencia: rojas@colpos.mx.

**Recibido:** 04 de Diciembre, 2017.

**Aceptado:** 23 de Marzo, 2018.

Nabor-Romero O, Silva-Valenzuela M, Rojas-Martínez RI, Garza-García R. 2018. First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 356-362.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1712-1

Primera publicación DOI: 17 de Abril, 2018.

First DOI publication: April 17, 2018.

**Resumen.** El consumo del zapote mante (*Pouteria campechiana*) en México se ha incrementado, siendo el municipio de El Mante, Tamaulipas, uno de los principales productores. En un huerto no comercial se observaron en frutos manchas hundidas de color marrón que coalescen. El objetivo de este estudio fue identificar el agente causal de la mancha del fruto de zapote mante. Con los hongos aislados se realizaron los postulados de Koch, se amplificó y secuenció la región ITS del ADNr mediante PCR utilizando los iniciadores universales ITS1-ITS4. El análisis morfológico y molecular indicó que

**Abstract.** The consumption of zapote mante (*Pouteria campechiana*) in Mexico has increased, being the municipality of El Mante, Tamaulipas, one of the main producers. In a non-commercial garden, sunken spots of brown color coalesced in fruits. The objective of this study was to identify the causal agent of the spot of fruit de zapote mante. With the fungi isolated, the Koch postulates were amplified, and the ITS region of the rDNA was amplified by PCR using the universal primers ITS1-ITS4. Morphological and molecular analysis indicated that the causal agent of the fruit blotch is the fungus *Cladosporium cladosporioides*. To our knowledge, this is the first report of this pathogen affecting this zapote mante in Mexico.

**Key words:** sunken spots, fungi, Koch postulate, PCR.

The genus *Pouteria* includes species for fruit production potential, among which is the zapote mante, also called yellow or canistel zapote (*P.*



*Cladosporium cladosporioides* es el agente causal de la mancha del fruto. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte de este patógeno afectando a zapote mante en México.

**Palabras clave:** mancha hundida, hongo, postulados de Koch, PCR.

En el género *Pouteria* se encuentran especies con alto potencial frutícola, entre las cuales se incluye al zapote mante, amarillo o canistel (*P. campechiana*). Su origen es el sur de México y Centro América. En México, su producción y comercialización va en aumento, su consumo es regional como alimento fresco o bien para fabricar alimentos procesados, obtener aceites para industria de cosméticos y como medicina. Esta zapotacea se produce en el municipio de El Mante, Tamaulipas; en donde se observaron frutos con manchas hundidas que provocan pudrición. No se sabe a partir de cuándo se presentó la enfermedad, ni el patógeno que la induce. El objetivo de esta investigación fue identificar al agente causal, mediante pruebas de patogenicidad, características morfológicas y pruebas moleculares.

En un huerto no comercial, en Ciudad Mante, municipio de El Mante, Tamaulipas, México, se colectaron 30 frutos de zapote mante; los cuales, presentaron manchas hundidas de color marrón a negro (1-3 cm de diámetro) en gran parte del epicarpio y que al tiempo coleasen. Los frutos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Enseguida, se colocaron en cámara húmeda a 27 °C y cuando se observó la esporulación, las estructuras fungosas se colocaron sobre una placa de papa dextrosa agar (PDA 39 g L<sup>-1</sup> de agua). Este procedimiento se realizó para cada fruto colectado, obteniéndose un total de 180 aislamientos, los cuales se mantuvieron en placas de PDA a 27 °C en oscuridad total.

*campechiana*). This species is native to southern Mexico and Central America. In Mexico, its production and marketing are increasing, as well as its regional consumption as fresh food or to manufacture processed foods, oils for the cosmetics industry, or as medication. This sapotacea is produced in the municipality of El Mante, Tamaulipas, Mexico, where fruits with sunken spots that cause rot have been observed. No one knows when the disease appeared nor the pathogen that causes it. The objective of this research was to identify the causal agent by performing pathogenicity, morphological and molecular tests.

In a non-commercial orchard in Ciudad Mante, municipality of El Mante, Tamaulipas, Mexico, 30 zapote mante fruits were collected that showed brown to black sunken spots (1-3 cm in diameter) on most of the epicarp which, in time, coalesced. The fruits were disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water. Then they were placed in a humid chamber at 27 °C, and when sporulation began, the fungal structures were placed on a petri dish containing potato-dextrose-agar (PDA 39 g L<sup>-1</sup> of water). This procedure was used for each collected fruit and a total of 180 isolates were obtained and kept on petri dishes with PDA at 27 °C in total darkness.

The morphology of the isolates was described with temporary and permanent preparations. The fungal structures were observed under a microscope and measured at least 50 times each. Later, the keys of Barnett and Hunter (1998) and Bensch *et al.*, (2012) were used to determine the genus. Based on the keys, the obtained isolates were termed MTCc (144 isolates), MTCO (22 isolates) and MT1 (14 isolates).

In the pathogenicity tests, only the MTCc and MTCO isolates (treatments) were used, and in each case, the morphotype was used most frequently. Forty symptomless ripe zapote mante fruits were

La descripción morfológica de los aislamientos se realizó con preparaciones temporales, y permanentes, se observaron bajo microscopio las estructuras fungosas y se midieron al menos 50 veces cada una de ellas, posteriormente para la determinación del género se siguieron las claves de Barnett y Hunter (1998) y Bensch *et al.* (2012). Con base en estas claves los aislamientos obtenidos se denominaron MTCc (144 aislamientos), MTCO (22 aislamientos) y MT1 (14 aislamientos).

En las pruebas de patogenicidad solo se utilizaron los aislamientos MTCc y MTCO (tratamientos) y en cada caso se utilizó el morfotipo con mayor frecuencia. Se inocularon 40 frutos maduros de zapote mante, asintomáticos, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se evaluaron dos niveles de inóculo,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^4$  conidios por mL para inocular dos grupos de 20 frutos. La suspensión de conidios se obtuvo a partir de cultivos monosporicos de los aislamientos MTCc y MTCO, respectivamente. En los frutos de cada tratamiento se produjeron pequeñas heridas con una aguja estéril, a las que se les asperjaron tres mL de la suspensión de conidios; de igual manera a los 20 frutos testigo se les produjeron pequeñas heridas con una aguja estéril y se les asperjó agua destilada estéril. Los 60 frutos de cada tratamiento se colocaron en una cámara húmeda a 27 °C durante 12 días, tiempo en el cual se registró el desarrollo de síntomas en los frutos; cuando estos fueron evidentes, se realizaron aislamientos de micelio crecido en el síntoma. Este experimento se repitió una vez más. Cabe señalar que en ambos ensayos el aislamiento denominado MTCO y el tratamiento testigo no indujeron ningún síntoma en los frutos inoculados. En contraste, el aislamiento MTCc con cada nivel de inóculo indujo síntomas muy similares a los observados en campo. Los reaislamientos obtenidos se denominaron MTCc-pp, se mantuvieron en placas de PDA a 27 °C en oscuridad total.

disinfected with 1% sodium hypochlorite and rinsed with sterile distilled water. Two levels of inoculum ( $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^4$  conidia per mL) were evaluated and used to inoculate two groups of 20 fruits. A conidial suspension was obtained from monosporic cultures of the MTCc and MTCO isolates. In the fruits of each treatment small cuts were made using a sterile needle, and then sprayed with 3 mL of the conidial suspension. Small cuts with a sterile needle were also made on the 20 control fruits, and sprayed with sterile distilled water. All 60 fruits in each treatment were placed in a moisture chamber at 27 °C for 12 days, during which the fruit developed symptoms; when the symptoms became evident, isolates of the mycelium growing on the symptoms were made. This experiment was repeated one more time. It should be noted that in both assays, neither the isolate called MTCO nor the control treatment induced symptoms in the inoculated fruits. In contrast, the MTCc isolate at each level of inoculum induced symptoms very similar to those observed in the field. The re-isolates obtained were named MTCc-pp and kept on petri dishes containing PDA at 27 °C in total darkness.

For the molecular characterization of the MTCc isolate and of the isolates obtained from the pathogenicity test (MTCc-pp), total genomic DNA was extracted. We used 200 mg of mycelium grown for five days in PD (potato dextrose) liquid medium and kept in a thermo-shaker at 112 rpm. The 200 mg of mycelium were incubated for 1 h at 60 °C in 1,000  $\mu$ L of extraction buffer (NaCl 0,7 M, Tris 0,1 M pH 7,5, 0,01 M EDTA pH 8,0, 1%  $\beta$ -ME and 1% CTAB) and moderately shaken every 5-10 min. Subsequently, 200  $\mu$ L of NaAc 3 M were added, and placed at -20 °C for 20 min, followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min. For DNA precipitation, 750  $\mu$ L of the supernatant were taken and placed in a new 1.5 mL tube; then, 750  $\mu$ L of cold isopropanol were added

Para la caracterización molecular del aislamiento MTCc y de los aislamientos obtenidos de la prueba de patogenicidad (MTCc-pp); se extrajo el ADN genómico total. Se utilizaron 200 mg de micelio crecido durante cinco días en medio líquido PD (papa dextrosa) mantenido en un termo agitador a 112 rpm. Los 200 mg de micelio se incubaron por 1 h a 60 °C en 1,000 µL de buffer de extracción (NaCl 0,7 M, Tris 0,1 M pH 7,5, 0,01 M EDTA pH 8,0, 1% β-ME, y 1% CTAB) agitando moderadamente cada 5-10 min. Posteriormente se le adicionó 200 µL de NaAc 3 M, y se colocó a -20 °C durante 20 min, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm por 10 min. Para la precipitación del ADN se tomaron 750 µL del sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo de 1,5 mL, enseguida se añadieron 750 µL de isopropanol frío y se mantuvo a -20 °C por 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó tres veces con 100 µL de etanol frío al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µL de agua libre de ADNas. Finalmente, el ADN se almacenó a -20 °C.

En la reacción en cadena de la polimerasa se usaron los iniciadores universales ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3'). La mezcla para PCR con un volumen final de 25 µL, consistió en agua libre de ADNas, buffer de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP's 2 mM, 1U de Taq ADN polimerasa (Promega®), iniciadores 1 pmol y 100 ng/µL de ADN, con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo a 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 30s, 55 °C por 30s y 72 °C por un min. Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1% + bromuro de etidio, en un fotodocumentador Gel-Doc 2,000. Posteriormente, el producto de PCR de los aislamientos MTCc y MTCc-pp se purificaron con el kit Wizard® SV gel

and kept at -20 °C for 20 min. After this period, they were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm, the supernatant was discarded, the pellet was washed three times with 100 µL of cold 70% ethanol, dried at room temperature and re-suspended in 30 µL of water free of DNase. Finally, the DNA was stored at -20 °C.

For the polymerase chain reaction, the universal primers ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') and ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3') were used. The mixture for the PCR with a final volume of 25 µL consisted of DNase-free water, 1X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP's 2 mM, 1U of Taq DNA polymerase (Promega®), 1 pmol primers and 100 ng/µL of DNA, with the following amplification conditions: one cycle at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for one min. The amplification products were visualized in 1% agarose gel + ethidium bromide in a Gel-Doc 2,000 photo-documentation system. Later, the products of the MTCc and MTCc-pp isolates obtained through PCR were purified using the Wizard® SV gel kit and PCR Clean-up System (Promega) and sequenced using an automatic 16-capillary DNA sequencer (Applied Biosystems, model 3130xl).

The obtained sequences were assembled using the Mega 7 program, where they were cleansed to correct possible sequencing errors; then they were aligned to obtain a consensus sequence of 572 base pairs, which was compared to the sequences reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the Blast tool. Then a phylogenetic analysis was performed following the Neighbor-Joining method with 5,000 bootstrap replications.

From the obtained isolates, two fungi were identified: *Colletotrichum* sp. (MTCO) and *Cladosporium* sp. (MTCc); a third one produced

and PCR Clean-up System (Promega) y se secuenciaron en un secuenciador automático de ADN de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl).

Las secuencias obtenidas se ensamblaron en el programa Mega 7, en donde se realizó una limpieza para corregir los posibles errores de secuenciación, posteriormente se alinearon para obtener una secuencia consenso de 572 pares de bases, la cual se comparó con secuencias reportadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante la herramienta Blast. Enseguida, se hizo un análisis filogenético usando el método Neighbor-Joining con 5,000 réplicas de bootstrap.

De los aislamientos obtenidos, se identificaron dos hongos: *Colletotrichum* sp. (MTCO) y *Cladosporium* sp. (MTCc) y un tercero que produjo un estroma esclerosado (MT1), el cual no fue identificado. *Cladosporium* sp. fue el que se presentó con mayor frecuencia con un 8.5% de asociación con las lesiones de la enfermedad. Los aislamientos de *Cladosporium* sp., presentaron características culturales similares, consistentes con las reportadas para este género (Bensch *et al.*, 2012). En el microscopio compuesto se observó la presencia de conidióforos cilíndricos macronematosos nodulosos alejados entre sí, con una sola célula conidiogénica, los conidios presentan uno o ningún septo y midieron de ancho 3 a 5  $\mu\text{m}$ , siendo estas características las reportadas para *C. cladosporioides* (Bensch *et al.*, 2012).

En las pruebas de patogenicidad, con los dos niveles de inóculo evaluados, se observaron zonas hundidas en el epicarpio 48 h después de la inoculación. A las 72 h, en las zonas hundidas se observaron manchas de color marrón que posteriormente se necrosaron y coalescieron en el fruto. Sobre las manchas, se desarrolló micelio de color blanco que presentaba estructuras morfológicas muy similares a las del aislamiento MTCc. Los reaislamientos

a sclerosed stroma (MT1), but was not identified. *Cladosporium* sp. was the most frequently present fungus and showed an 80.5% association with the disease lesions. The *Cladosporium* sp. isolates showed similar culture traits consistent with those reported for this genus (Bensch *et al.*, 2012). The presence of nodulous macronematous cylindrical conidiophores far from each other, with a single conidiogenic cell was observed under a compound microscope; conidia had one or no septum and were 3 to 5  $\mu\text{m}$  wide, which are characteristics reported for *C. cladosporioides* (Bensch *et al.*, 2012).

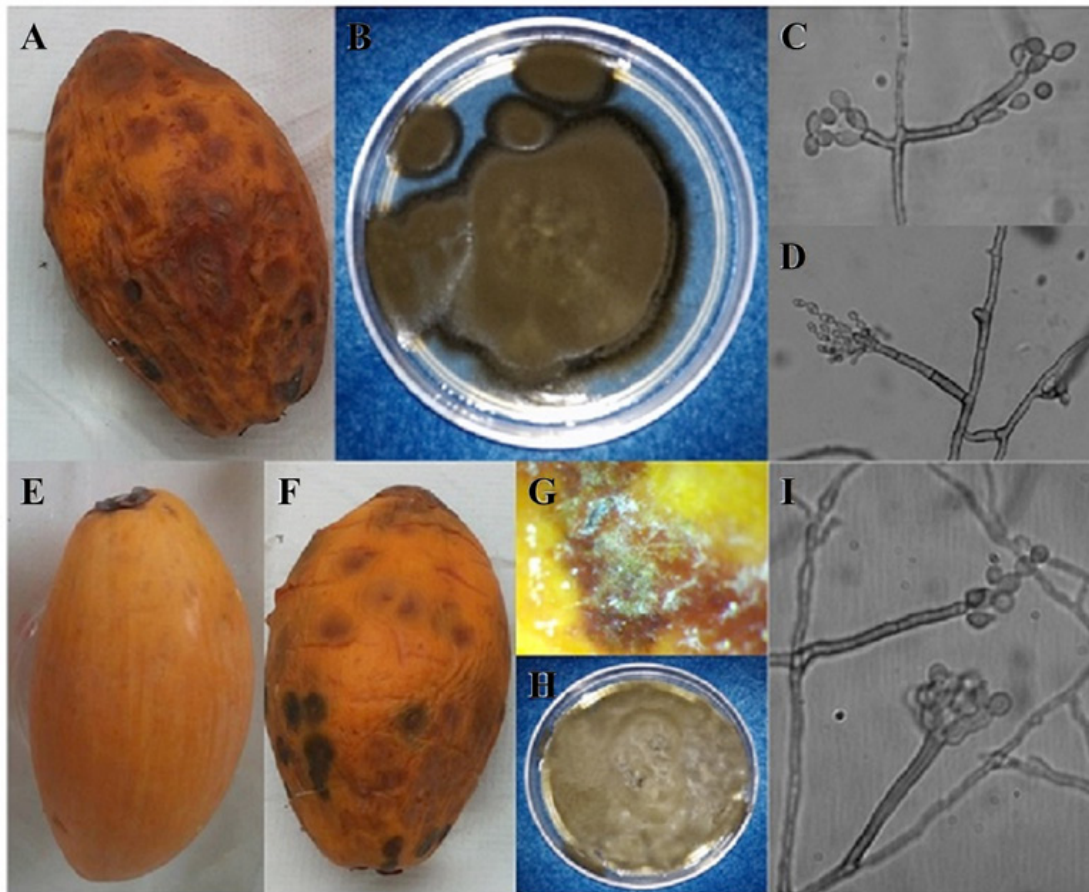
In the pathogenicity tests using the two evaluated inoculum levels, sunken areas were observed in the epicarp 48 h after inoculation. At 72 h, brown spots were observed on the sunken areas which later became necrotic and coalesced on the fruit. White mycelium grew on the spots and had morphological structures very similar to those of the MTCc isolate. The re-isolates obtained coincided with the culture and morphological traits of the isolate, which proved that this isolate produced the sunken spots in zapote mante (Figure 1).

The obtained sequences were analyzed using the NCBI BLAST tool and the results showed that they were 99% similar to the sequences reported for *Cladosporium cladosporioides*. The sequence of the MTCc isolate was deposited in the GenBank (access number KP788715). In the phylogenetic analysis, the identity of the MTCc isolate was established based on its close relationship with isolates reported as *Cladosporium cladosporioides*. The symptoms observed coincide with those described for *Cladosporium cladosporioides*, which affects tangerine (*Citrus reticulata*), papaya (*Papaya carica*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and mango (*Mangifera indica* L.) (Guillen-Sánchez *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2012; Tashiro *et al.*, 2013), and demonstrates the impact of this pathogen on different fruit crops; it also reduces



obtenidos coincidieron con las características culturales y morfológicas de dicho aislamiento, demostrándose así que esta originaba la mancha hundida en frutos de zapote mante (Figura 1).

their commercial value due to the unpleasant appearance of the epicarp. As far as we know, this is the first time in Mexico that *Cladosporium cladosporioides* has been reported to produce necrotic spots on zapote mante fruits.



**Figura 1.** Caracterización morfológica y pruebas de patogenicidad de *Cladosporium cladosporioides* en frutos de zapote mante (*Pouteria campechiana*) en Ciudad Mante, Tamaulipas, México. A) Fruto con manchas hundidas de color marrón; B) Aislamiento MTCc; C y D) Conidióforos macronematosos nodulosos y conidios elipsoidales de *Cladosporium cladosporioides*. E-I) Pruebas de patogenicidad; E) Fruto utilizado como testigo; F) Fruto inoculado con zonas hundidas de color marrón; G) Presencia de estructuras morfológicas del aislamiento MTCc en fruto inoculado; H) Reaislamiento obtenido de fruto inoculado en pruebas de patogenicidad; I) Conidióforos y conidios de *Cladosporium cladosporioides*.

**Figure 1.** Morphological characterization and pathogenicity tests were used to identify *Cladosporium cladosporioides* in zapote mante fruits (*Pouteria campechiana*) in Ciudad Mante, Tamaulipas, Mexico. A) Fruit with brown sunken spots; B) MTCc isolate; C and D) macronematous and ellipsoidal conidiophores of *Cladosporium cladosporioides*. E-I) Pathogenicity tests; E) Fruit used as a control; F) Inoculated fruit showing brown sunken areas; G) Presence of morphological structures on the MTCc isolate on inoculated fruit; H) Re-isolate obtained from inoculated fruits in pathogenicity tests; I) Conidiophores and conidia of *Cladosporium cladosporioides*.



Las secuencias obtenidas se analizaron con la herramienta BLAST del NCBI, en donde se observó un 99% de similitud con secuencias reportadas de *Cladosporium cladosporioides*. La secuencia del aislamiento MTCc se depositó en el GenBank (número de acceso KP788715). En el análisis filogenético se comprobó la identidad del aislamiento MTCc al establecer una estrecha relación con aislamientos reportados como *Cladosporium cladosporioides*.

Los síntomas observados, coinciden con los descritos para *Cladosporium cladosporioides* afectando mandarina (*Citrus reticulata*), papaya (*Papaya carica*), maracuyá (*Passiflora edulis*), y mango (*Mangifera indica* L.) (Guillen-Sánchez *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2012; Tashiro *et al.*, 2013) demostrando el impacto de este patógeno en diferentes frutales, al disminuir su valor comercial debido a la apariencia desagradable del epicarpio. Hasta donde se conoce este es el primer reporte en México de *Cladosporium cladosporioides* causando manchas necróticas en frutos de zapote mante.

## CONCLUSIONES

Mediante los postulados de Koch y pruebas moleculares se comprueba que el patógeno responsable de inducir las manchas hundidas en el fruto de zapote mante *Pouteria campechiana*, es *Cladosporium cladosporioides* y representa el primer reporte de esta especie parasitando a frutos de mante.

## CONCLUSIONS

Whit Koch postulates and molecular tests, we proved that the pathogen responsible for inducing sunken spots on zapote mante (*Pouteria campechiana*) is *Cladosporium cladosporioides*; this is the first time this species has been reported to infest zapote mante fruits.

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

LITERATURA CITADA

- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minn. 218p.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72:1-401. DOI: 10.3114/sim0003
- Guillén-Sánchez D, Yañez-Morales M.J, Téliz-Ortiz D, Siebe-Grabach C and Bautista-Baños S. 2007. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium tenuissimum* Cooke (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on mango tree panicles: symptoms, pathogenicity and severity of the fungus. Fruits 62:361-368. DOI: 10.1051/fruits:2007032
- Tashiro N, Noguchi M, Ide Y and Kuchiki F. 2013. Sooty spot caused by *Cladosporium cladosporioides* in Postharvest Satsuma mandarin grow in heated greenhouses. Journal of General Plant Pathology 79:158-161. DOI: 10.1007/s10327-013-0430-1
- Vásquez LA, Hernández CE, Mora A JA, Nava DC y Sánchez GF. 2012. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. Agrociencia 46:757-767. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_artext&pid=S1405-31952012000800002