

# Microorganisms associated with alfalfa crown rot in north central Mexico

## Microorganismos asociados con la pudrición de corona de alfalfa en el norte centro de México

**Rodolfo Velásquez-Valle, Luis Roberto Reveles-Torres\***, Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Km. 24.5 Carretera Zacatecas - Fresnillo, C.P. 98500, Calera de V. R., Zacatecas; **Hugo Talavera-Correa**, Unidad Académica de Biología, Universidad Autónoma de Zacatecas. \*Autor para correspondencia: reveles.roberto@inifap.gob.mx.

Recibido: 13 de Junio, 2018.

Aceptado: 03 de Agosto, 2018.

Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Talavera-Correa H. 2018. Microorganisms associated with alfalfa crown rot in north central Mexico. *Revista Mexicana de Fito patología* 36(3); 414-422.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1806-1

Primera publicación DOI: 17 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 17, 2018.

**Resumen.** La alfalfa es un importante cultivo forrajero en los estados de Aguascalientes, Durango y Zacatecas localizados en el norte centro de México. Información sobre los manchones de plantas muertas atribuidas a la enfermedad conocida como pudrición de la corona y sus microorganismos asociados es muy escasa en esta región, consecuentemente, el objetivo del actual trabajo fue identificar los géneros de microorganismos asociados a la pudrición de la corona en los estados mencionados. Muestras de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona y el suelo alrededor de ellas fueron recolectadas en 30 parcelas de alfalfa. Trece

**Abstract.** Alfalfa is an important forage crop in the states of Aguascalientes, Durango, and Zacatecas located in the northern-center of Mexico. Very scarce information is available on the spots of killed plants attributed to the disease known as crown rot and its associated microorganisms in this region. Therefore, the objective of the current work was to identify the genera of microorganisms associated to crown rot in the mentioned states. Samples of alfalfa plants showing crown rot symptoms and soil around them were collected in 30 alfalfa fields. Thirteen nematodes genera were identified in the soil samples: (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus*, and *Xiphinema*) as well as five fungi (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*) and oomycetes (*Phytophthora*, and *Pythium*) genera in the crown tissues. It is remarkable the high incidence of *Ditylenchus* (56.7%), *Pratylenchus* (50%) and *Fusarium* fungi (100%).

géneros de nematodos fueron identificados en las muestras de suelo: *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* y *Xiphinema*, así como cinco géneros de hongos (*Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*) y oomicetos (*Phytophthora* y *Pythium*) en los tejidos de la corona. Se destaca la alta incidencia de los nematodos *Ditylenchus* (56.7%) y *Pratylenchus* (50%) y del hongo *Fusarium* (100%).

**Palabras clave:** hongos, nematodos, oomicetos, distribución regional.

La producción de alfalfa (*Medicago sativa*) representa el 27% de la producción nacional de forraje. En México la superficie cultivada con esta forrajera durante 2018 fue de poco más de 387,000 hectáreas donde se obtuvo un rendimiento promedio de 58.7 t ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> de forraje en verde (SIAP, 2018). Los estados con mayor producción de alfalfa a nivel nacional son Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Baja California, Sonora, Durango, Coahuila y Puebla que en conjunto aportan el 70% de la producción nacional (Lara y Jurado, 2014). La alfalfa es un cultivo importante en el norte centro de México, donde se localizan los estados de Aguascalientes, Durango (Los Llanos) y Zacatecas; en esta área se han observado manchones de plantas muertas de alfalfa de dimensiones variables en la mayoría de las parcelas comerciales, pero existe escasa o ninguna información respecto a los organismos asociados con la pudrición de la corona o a las pérdidas que esta enfermedad provoca en la región. La pudrición de la corona de alfalfa se encuentra diseminada mundialmente; algunas especies de *Fusarium* se encuentran entre los hongos más comunmente aislados de las coronas y raíces necróticas de plantas

**Key words:** fungi, nematodes, oomycetes, regional distribution.

Alfalfa (*Medicago sativa*) is a perennial crop that accounts for 27% of national forage production. In Mexico, the area sown to alfalfa in 2018 was a bit more than 387,000 hectares with an average yield of green forage of 58.7 t ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> (SIAP, 2018). The states with the highest alfalfa production at the national level are Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Baja California, Sonora, Durango, Coahuila and Puebla, which together account for 70% of national production (Lara and Jurado, 2014). Alfalfa is an important crop in north-central Mexico, where the states of Aguascalientes, Durango (Los Llanos) and Zacatecas are located. Large variable-sized spots of dead alfalfa plants have been observed in most commercial plots, but there is little or no information about the organisms that cause crown rot or the extent of losses caused by the disease. Alfalfa crown rot is spread throughout the world. Several *Fusarium* species are among the fungi most commonly isolated from necrotic crowns and roots of alfalfa plants (Uddin and Knous, 1991); in Sudan, Ao *et al.* (2018) mention that *Fusarium*, *Rhizoctonia* and some *Pythium* species are present in alfalfa plots. On the other hand, in Mexico, Chew (2000) noted there was a high incidence of crown rot in alfalfa plots in the Comarca Lagunera (region of lagoons). In the Mexican state of Guanajuato, *F. incarnatum* was reported as being the causal agent of alfalfa root rot (Esteban-Santiago *et al.*, 2016). Velásquez-Valle (2001) reported the presence of galls on the roots of alfalfa plants collected in Aguascalientes. Other studies have reported the presence of bulb nematodes (*Ditylenchus dipsaci*) on alfalfa leaf samples collected in the state of Jalisco (Rosas-Hernández *et al.*, 2017). Alfalfa productivity in this region could increase by

de alfalfa (Uddin y Knous, 1991); en Sudán, Ao *et al.* (2018) mencionaron la presencia de *Fusarium*, *Rhizoctonia* y algunas especies de *Pythium* en parcelas de alfalfa. Por otra parte, en México Chew (2000) señaló la alta incidencia de la pudrición de la corona en las parcelas de alfalfa de la Comarca Lagunera. En el estado de Guanajuato se reportó a *F. incarnatum* como el agente causal de la pudrición de las raíces de alfalfa (Esteban-Santiago *et al.*, 2016). Velásquez-Valle (2001) reportó la presencia de agallas en las raíces de plantas de alfalfa recolectadas en Aguascalientes. Otros estudios han revelado la presencia del nematodo de los bulbos (*Ditylenchus dipsaci*) en muestras foliares de alfalfa recolectadas en el estado de Jalisco (Rosas-Hernández *et al.*, 2017). La productividad del cultivo de alfalfa en esta región puede elevarse mediante la aplicación de medidas fitosanitarias que reduzcan el problema de pudrición de la corona; sin embargo, dichas medidas deben poseer un sólido fundamento en el conocimiento de los organismos potencialmente causales de esa enfermedad. El objetivo del trabajo consistió en identificar los géneros de microorganismos asociados con plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en Aguascalientes, Durango y Zacatecas, México.

Entre enero y agosto de 2017 se recolectaron muestras de raíces de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona, así como suelo de alrededor de las plantas en 30 parcelas comerciales, de las cuales el 50, 30 y 20% se ubicaron en los estados de Zacatecas, Aguascalientes y Durango, respectivamente. En cada parcela se seleccionaron al azar tres plantas con poco crecimiento, follaje escaso y amarillo, frecuentemente con síntomas de marchitez. Las plantas se extrajeron con la mayor cantidad posible de raíces y se tomó una submuestra de suelo en cada una de ellas; el suelo obtenido alrededor de cada planta se mezcló para obtener la muestra compuesta representativa. La corona

implementing phytosanitary measures to reduce the crown rot problem. However, these measures must be solidly based on knowledge of the organisms that could be the potential causes of the disease. The objective of this study was to identify the genera of microorganisms associated with alfalfa plants presenting crown rot symptoms in Aguascalientes, Durango and Zacatecas, Mexico.

Between January and August 2017, samples of alfalfa roots with crown rot symptoms and of the soil surrounding the plants were collected from 30 commercial plots, of which 50, 30 and 20% were in Zacatecas, Aguascalientes and Durango, respectively. Three stunted plants with a few yellow leaves, most of them with wilt symptoms, were randomly collected from each plot. The plants were extracted with as many of the roots as possible, and a subsample of the soil surrounding each plant was taken; this soil was mixed together to obtain a representative compound sample. The crown of each plant was rinsed with tap water and tissue was taken from its center. The tissue was then disinfected and cultivated in Petri dishes containing a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). The Petri dishes were incubated at  $28 \pm 1$  °C in a bacteriological oven (Felisa, Mod. FE 131) for three or four days. The genera of the resulting colonies of fungi or oomycetes were identified using the taxonomical keys of Barnett (1967) and Watanabe (1994). To extract thread-like nematodes, each soil sample was homogenized and then a 50-g subsample of each was taken and placed in a Baermann funnel, according to the methodology proposed by Cepeda (1995). The genera of the recovered nematodes were identified using the taxonomic keys and information provided by Mai and Mullin (1996), Kanzaki and Giblin-Davis (2012) and Castillo *et al.* (2012). The roots were examined to detect galls caused by the *Meloidogyne* nematode.

de cada planta se enjuagó en agua corriente y se obtuvo el tejido de la parte central, se desinfectó y sembró en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). Las cajas se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  en una estufa bacteriológica (Felisa, Mod. FE 131) por tres a cuatro días. Las colonias de hongos u oomicetos resultantes se identificaron a nivel género con ayuda de las claves taxonómicas de Barnett (1967) y Watanabe (1994). Para la extracción de nematodos filiformes, cada muestra de suelo se homogenizó y se obtuvo una submuestra de 50 g que se colocó en un embudo de Baermann por parcela comercial, de acuerdo con la metodología propuesta por Cepeda (1995). Los nematodos recuperados fueron identificados a nivel género utilizando las claves taxonómicas e información proporcionada por Mai y Mullin (1996), Kanzaki y Giblin-Davis (2012) y Castillo *et al.* (2012). Las raíces se examinaron en busca de agallas causadas por el nematodo *Meloidogyne*.

Los resultados mostraron que en las muestras de raíces se identificaron cinco géneros de hongos u oomicetos potencialmente fitopatógenos al cultivo (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* y *Phytophthora*) y en el suelo se identificaron 13 géneros de nematodos fitoparásitos, depredadores y de vida libre (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* y *Xiphinema*). Los nematodos más frecuentemente identificados fueron *Aphelenchus*, *Rhabditis* y *Dorylaimus*, (96.7, 73.3 y 70% respectivamente); por el contrario, *Criconemoides*, *Trichodorus* y *Xiphinema* fueron los menos frecuentes (3.3% en cada caso) (Cuadro 1).

Es importante señalar la presencia de *Ditylenchus* en aproximadamente 57% de las parcelas de alfalfa muestreadas en los tres estados; se debe

The results showed there were five genera of fungi or oomycetes on the root samples that are potentially phytopathogenic to the crop (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* and *Phytophthora*), while the results of soil samples showed 13 genera of phytoparasite, predator and free-living nematodes (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* and *Xiphinema*). The most frequently identified nematodes were *Aphelenchus*, *Rhabditis* and *Dorylaimus* (96.7, 73.3 and 70%, respectively). In contrast, *Criconemoides*, *Trichodorus* and *Xiphinema* were identified the least frequently (3.3% in each case) (Table 1).

It should be noted that *Ditylenchus* was present in approximately 57% of the alfalfa plots sampled

**Cuadro 1. Frecuencia de detección de nematodos en la rizosfera de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en parcelas de Aguascalientes, Durango y Zacatecas, México.**

**Table 1. Frequency of nematode detection in the rhizosphere of alfalfa plants with crown rot symptoms in plots in Aguascalientes, Durango and Zacatecas, Mexico.**

Género	Frecuencia de detección (%)	Distribución
<i>Aphelenchus</i>	96.7	AGS <sup>x</sup> , DGO <sup>y</sup> , ZAC <sup>z</sup>
<i>Aphelenchoides</i>	13.3	DGO, ZAC
<i>Criconemoides</i>	3.3	ZAC
<i>Ditylenchus</i>	56.7	AGS, DGO, ZAC
<i>Dorylaimus</i>	70.0	AGS, DGO, ZAC
<i>Helicotylenchus</i>	6.6	AGS, DGO
<i>Mononchus</i>	16.7	AGS, DGO, ZAC
<i>Pratylenchus</i>	50.0	AGS, DGO, ZAC
<i>Psilenchus</i>	6.6	AGS, ZAC
<i>Rhabditis</i>	73.3	AGS, DGO, ZAC
<i>Trichodorus</i>	3.3	AGS
<i>Tylenchus</i>	33.3	AGS, DGO, ZAC
<i>Xiphinema</i>	3.3	ZAC

<sup>x</sup> Aguascalientes, <sup>y</sup> Durango, <sup>z</sup> Zacatecas.

destacar un estudio realizado por Boelter *et al.* (1985) quienes indicaron la asociación de *D. dipsaci* con la muerte invernal de plantas de alfalfa y la reducción en el rendimiento de forraje, por lo que es posible que su daño al cultivo en esta región de México se confunda o subestime como efecto de bajas temperaturas invernales. Por otro lado, se debe resaltar su ausencia en los muestreos realizados por Chew (2000) en parcelas de alfalfa de la Comarca Lagunera. También Williams-Woodward y Gray (1999), así como Milano de Tomasel y McIntyre (2001) señalaron que es frecuente que las infestaciones por *D. dipsaci* en plantas de alfalfa ocurran en conjunto con las de *Aphelenchoides ritzemabosi*, tanto en suelo como en el follaje de alfalfa; en el actual trabajo se detectó la presencia simultánea de *Aphelenchoides* y *Ditylenchus* en las muestras de suelo provenientes de dos parcelas ubicadas en el sureste de Zacatecas; además se encontró a *Aphelenchoides* en otras dos parcelas en Durango, pero en estas no se detectó a *Ditylenchus*.

De acuerdo con Castillo *et al.* (2012), *Pratylenchus penetrans* se encuentra distribuido en el continente americano donde parasita más de 350 hospedantes incluyendo la alfalfa; los resultados del actual trabajo muestran que especímenes del género *Pratylenchus* se encontraron en las muestras de suelo del 50% de las parcelas de alfalfa muestreadas en los tres estados. De acuerdo con Chew (2000) este nematodo está presente en las parcelas de alfalfa de Coahuila y Durango. Mauza y Webster (1982) demostraron una interacción sinérgica entre poblaciones de *P. penetrans* y el hongo *Fusarium oxysporum* en plántulas de alfalfa, aunque *F. solani* no fue patogénico a las plántulas de alfalfa, en cambio, redujo las poblaciones de *P. penetrans*; es importante resaltar que en el actual estudio la presencia de *Fusarium* en el tejido de la corona de plantas de alfalfa, fue coincidente con la de *Pratylenchus* en las muestras de suelo, aunque esta información

in the three states, it is important to highlight a study conducted by Boelter *et al.* (1985), who indicated the association of *D. dipsaci* with the death in winter of alfalfa plants and reduced forage yield. Thus, it could be that the damage caused by the nematode in this region of Mexico is underestimated or mistaken for the effect of low winter temperatures. On the other hand, we should highlight that the nematode was not present in samplings conducted by Chew (2000) in alfalfa plots in the Comarca Lagunera. Williams-Woodward and Gray (1999), and Milano de Tomasel and McIntyre (2001) also pointed out that *D. dipsaci* infestations frequently occur in conjunction with *Aphelenchoides ritzemabosi*, both in the soil and on alfalfa foliage. In the present study, we detected the simultaneous presence of *Aphelenchoides* and *Ditylenchus* in soil samples taken from two alfalfa plots in southeastern Zacatecas. *Aphelenchoides* was also found in two alfalfa plots in Durango, but not *Ditylenchus*.

According to Castillo *et al.* (2012), *Pratylenchus penetrans* is distributed all over the Americas, where it parasitizes more than 350 hosts, including alfalfa. The results of this study show that specimens of the *Pratylenchus* genus were found in 50% of the alfalfa plots sampled in the three states. According to Chew (2000), this nematode is present in alfalfa plots in Coahuila and Durango. Mauza and Webster (1982) demonstrated a synergistic interaction between *P. penetrans* and *Fusarium oxysporum* populations in alfalfa seedlings. Although *F. solani* was not pathogenic to alfalfa seedlings, it reduced *P. penetrans* populations. It is important to point out that in this study the presence of *Fusarium* in alfalfa plants' crown tissue coincided with the presence of *Pratylenchus* in the soil samples, though this information can be confirmed later by extracting nematodes from the crown tissue.

The *Aphelenchus* genus includes species considered to be biological control agents of fungal

puede confirmarse posteriormente mediante la extracción de nematodos del tejido de la corona.

El género *Aphelenchus* abarca especies consideradas como agentes de control biológico de microorganismos fungosos, así como especies fitopatógenas facultativas, aunque no se han reportado daños severos en especies de importancia agrícola (Kanzaki y Giblin-Davis, 2012). *Aphelenchus avenae* se encuentra ampliamente distribuida sobre rizomas, tubérculos, bulbos y raíces en descomposición; se le reportó en lesiones causadas por *Pythium arrhenomanes* en raíces de maíz (*Zea mays*), pero no sobre raíces sanas (Mai y Mullin, 1996). Es probable que la alta incidencia (96.7%) de este nematodo en el presente estudio se deba a la descomposición de los tejidos de la corona de la planta.

En una tercera parte de las muestras de suelo se encontraron especímenes pertenecientes a *Tylenchus*. Según Thorne (1961), los miembros de *Tylenchus* se encuentran entre los nematodos más frecuentemente hallados en la rizosfera, sin embargo, no han sido reportados como fitoparásitos, a excepción de *T. costatus*.

Se identificó un espécimen de *Xiphinema* en una parcela de alfalfa en Zacatecas; previamente se había señalado (Chew, 2000) su presencia en alfalfa en los estados de Coahuila y Durango; la incidencia de éste género en esta leguminosa ha sido mencionada también por Wojtowicz *et al.* (1982) en el estado de Pennsylvania, EU. *Trichodorus* fue detectado en una parcela de alfalfa en Aguascalientes; es importante indicar que Thorne (1961) había indicado que esta forrajera era un hospedante poco favorable para este nematodo.

No se detectaron agallas causadas por nematodos como *Meloidogyne*; este resultado coincide con el obtenido por Chew (2000) en parcelas con esta forrajera en la Comarca Lagunera, aunque un reporte previo hace referencia a la presencia de agallas por ese nematodo en una parcela de alfalfa en Aguascalientes (Velásquez-Valle, 2001).

microorganisms and facultative phytopathogenic species, although severe damage has not been reported on major agricultural species (Kanzaki and Giblin-Davis, 2012). *Aphelenchus avenae* is widely distributed on decaying rhizomes, tubers, bulbs and roots. It was found on lesions caused by *Pythium arrhenomanes* on maize roots (*Zea mays*) but not on healthy roots (Mai and Mullin, 1996). The high incidence of this nematode (96.7%) found in this study is probably due to the decaying tissues in the plant's crown.

In one third of soil samples, specimens belonging to *Tylenchus* were found. According to Thorne (1961), members of the *Tylenchus* family are among the nematodes most frequently found in the rhizosphere; however, except for *T. costatus*, they have not been reported as phytoparasites.

A *Xiphinema* specimen was identified in an alfalfa plot in Zacatecas; it had been previously reported (Chew, 2000) on alfalfa crops in the states of Coahuila and Durango. Wojtowicz *et al.* (1982) also reported the incidence of this genus on alfalfa in the state of Pennsylvania, USA. *Trichodorus* was detected in an alfalfa plot in Aguascalientes. It is important to mention that Thorne (1961) had indicated that alfalfa was not a good host of this nematode.

No galls caused by nematodes such as *Meloidogyne* were detected, and this result is in agreement with that obtained by Chew (2000) in alfalfa plots in the Comarca Lagunera. However, a previous report mentioned the presence of galls caused by this nematode in an alfalfa plot in Aguascalientes (Velásquez-Valle, 2001).

The alfalfa plants collected had scant foliage, most frequently a dull green to yellowish in color, and smaller in size than non-affected plants; other symptoms such as stunting and necrosis were observed as well. The crown of these plants had brown-to-black lesions frequently extending towards the root's vascular tissues, according to the syndrome described by Uddin and Knous (1991).

Las plantas de alfalfa recolectadas tenían escaso follaje, frecuentemente de color verde opaco a amarillo y de menor tamaño que el de plantas no afectadas, otros síntomas como enanismo y muerte de las plantas también fueron observados. La corona de estas plantas manifestaba lesiones de color café a negro que con frecuencia se extendían hacia los tejidos vasculares de la raíz en coincidencia con el síndrome descrito por Uddin y Knous (1991).

De estos síntomas se aislaron e identificaron cinco géneros de microorganismos; los hongos *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium* así como los oomicetos *Phytophthora* y *Pythium* (Cuadro 2).

Es importante resaltar la elevada incidencia en las parcelas de alfalfa de cada estado y por ende, regional de los hongos *Fusarium* y *Rhizoctonia* asociados con la pudrición de la corona (Cuadro 2). Un grupo de especies de *Fusarium* han sido asociadas con la enfermedad: *F. incarnatum*, *F. solani*, *F. roseum*, *F. oxysporum* entre otras (McKenzie y Davidson, 1975; Mauza y Webster, 1982; Esteban-Santiago *et al.*, 2016). Es necesario recordar que no todas las especies de *Fusarium* son patogénicas a la alfalfa (Mauza y Webster, 1982) por lo que es necesario continuar con los trabajos de identificación y patogenicidad que permitan definir el papel de este hongo en la pudrición de la corona de la alfalfa. Según Chew (2000) *Fusarium* sp. resultó el hongo

Based on these symptoms, five genera of microorganisms were isolated and identified: *Fusarium*, *Rhizoctonia* and *Verticillium* fungi, as well as *Phytophthora* and *Pythium* oomycetes (Table 2).

It is worth mentioning the high incidence of *Fusarium* and *Rhizoctonia* in alfalfa plots in each state, and consequently, at the regional level; these two fungi are associated with crown rot (Table 2). A group of *Fusarium* species has been associated with the disease: *F. incarnatum*, *F. solani*, *F. roseum*, *F. oxysporum*, among others (McKenzie and Davidson, 1975; Mauza and Webster, 1982; Esteban-Santiago *et al.*, 2016). We need to keep in mind that not all the *Fusarium* species are pathogenic to alfalfa (Mauza and Webster, 1982), so further identification and pathogenicity research needs to be done in order to define the role they play in alfalfa crown rot. According to Chew (2000), *Fusarium* sp. was the fungus most frequently found on alfalfa plants with crown rot symptoms in the Comarca Lagunera, which is in agreement with the results of this study.

*Rhizoctonia solani* has been reported to be the causal agent of the damping-off of alfalfa seedlings and of lesions at the base of alfalfa sprouts (Vincelli and Herr, 1992; Fowler *et al.*, 1999). In the Comarca Lagunera, Chew (2000) reported that

**Cuadro 2. Frecuencia de detección de hongos y oomicetos a partir de la corona de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en parcelas de Aguascalientes, Durango y Zacatecas, México.**

**Table 2. Frequency of fungi and oomycete detection on alfalfa plants with crown rot symptoms in plots in Aguascalientes, Durango and Zacatecas, Mexico.**

Patógeno	Frecuencia de aislamiento (%)			
	Aguascalientes	Durango	Zacatecas	Norte centro
<i>Fusarium</i>	100	100	100	100
<i>Rhizoctonia</i>	88.9	83.3	100	93.3
<i>Verticillium</i>	33.3	16.7	66.7	46.7
<i>Phytophthora</i>	0.0	0.0	13.3	6.7
<i>Pythium</i>	83.3	33.3	60.0	53.3

mayormente encontrado en plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en la región de la Comarca Lagunera, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El hongo *Rhizoctonia solani* ha sido reportado como el agente causal del damping-off de plántulas de alfalfa y de lesiones en la parte basal de los brotes (Vincelli y Herr, 1992; Fowler *et al.*, 1999). En la Comarca Lagunera, Chew (2000) lo reportó con mayor frecuencia en plantas de alfalfa con pudrición de la corona, solamente superado por *Fusarium*.

Según Larkin *et al.* (1995) algunos microorganismos radiculares de la alfalfa como *Phytophthora* y *Pythium* han sido asociados con dificultades en el desarrollo y establecimiento de poblaciones de esta forrajera. *Phytophthora* se identificó en dos parcelas de alfalfa en los municipios de Calera y Luis Moya, Zacatecas. Algunas especies de *Phytophthora* han sido señaladas como patógenicas a alfalfa; la infección de raíces de alfalfa por *P. megasperma* redujo la tasa de desarrollo en plantas adultas y en infecciones severas provocó síntomas como follaje amarillo, marchitez y defoliación prematura (Marks y Mitchell, 1971). Por otro lado, la incidencia de *Pythium* en esta región resultó de 53.3% (Cuadro 2); una situación similar se reportó en Sudán (Ao *et al.*, 2018) donde la incidencia combinada de cuatro especies de *Pythium* alcanzó el 44%.

En conclusión, se identificaron 13 géneros de nematodos (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* y *Xiphinema*) en la rizosfera de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona; tres géneros de hongos (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*) y dos géneros de oomicetos (*Phytophthora* y *Pythium*) asociados a la pudrición de la corona de plantas de alfalfa.

after *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* was the fungus found most frequently on alfalfa plants with crown rot.

According to Larkin *et al.* (1995), some alfalfa root microorganisms, such as *Phytophthora* and *Pythium*, have been associated with limited development and establishment of alfalfa populations. *Phytophthora* was identified in two alfalfa plots in the municipalities of Calera and Luis Moya, Zacatecas. Some *Phytophthora* species have been classified as pathogenic to alfalfa. For example, alfalfa roots infected by *P. megasperma* reduced the development rate in adult plants, and severe infections caused symptoms such as yellow foliage, wilting and premature defoliation (Marks and Mitchell, 1971). On the other hand, the incidence of *Pythium* in the region was 53.3% (Table 2). A similar situation was reported in Sudan (Ao *et al.*, 2018), where the combined incidence of four *Pythium* species reached 44%.

In conclusion, 13 genera of nematodes were identified (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* and *Xiphinema*) in the rhizosphere of alfalfa plants with crown rot symptoms; three genera of fungi (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*) and two of oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) were associated with crown rot on alfalfa plants.

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

## LITERATURA CITADA

- Ao S, Bucciarelli B, Dornbusch MR, Miller SS, and Samac DA. 2018. First report of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed



- rot, seedling root rot, and damping-off caused by *Pythium* spp. in Sudanese soil. *Plant Disease* 102:1043. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-17-1411-PDN>
- Barnett HL. 1967. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Second Edition. Burgess Publishing Company. 225 p.
- Boelter HR, Gray AF, and Delaney HR. 1985. Effect of *Ditylenchus dipsaci* on alfalfa mortality, winterkill, and yield. *Journal of Nematology* 17:140-144. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618429/>
- Castillo P, Stanley J, Inserra RN, and Manzanilla-López RH. 2012. *Pratylenchidae*-the lesión nematodes. Pp. 411-478. In: *Practical Plant Nematology*. (Ed. by R.H. Manzanilla-López and N. Marbán-Mendoza). Biblioteca Básica de Agricultura. Guadalajara, Jalisco, México. 883 p.
- Cepeda SM. 1995. *Prácticas de Nematología Agrícola*. Primera edición. Editorial Trillas. 109 p.
- Chew MIY. 2000. Enfermedades de la alfalfa. In: *Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México*. Libro Técnico No. 2. Campo Experimental La Laguna – INIFAP. 102 p. Disponible en línea: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1938/produccionyutilizaciondelaalfalfaenlazonanortedemexico.pdf?sequence=1>
- Esteban-Santiago JM, Leyva-Mir SG, Royan IM, Camacho-Tapia M y Tovar-Pedraza JM. 2016. Identificación del agente causal de la pudrición de la raíz y hongos asociados a semilla de alfalfa (*Medicago sativa*) en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34 (Suplemento):S59. Disponible en línea: [http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen342016/Resumen\\_Poster\\_S342016.pdf](http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen342016/Resumen_Poster_S342016.pdf)
- Fowler MC, Miller-Garvin JE, Regulinski DP, and Viands DR. 1999. Association of alfalfa radicle length with *Rhizoctonia* damping off. *Crop Science* 39:659-661. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302918657>
- Kanzaki N. and Giblin-Davis RM. 2012. *Aphelenchoidea*. Pp. 161-208. In: *Practical Plant Nematology*. (Ed. by R.H. Manzanilla-López and N. Marbán-Mendoza). Biblioteca Básica de Agricultura. Guadalajara, Jalisco, México. 883 p.
- Lara MCR y Jurado GP. 2014. Paquete tecnológico para producir alfalfa en el estado de Chihuahua. Sitio Experimental La Campana-INIFAP. Folleto Técnico Núm. 52. Chihuahua, Chih. México. 53 p. Disponible en línea: <https://www.producechihuahua.org/paqs/PT-0010Alfalfa.pdf>
- Larkin RP, English JT, and Mihail JD. 1995. Effects of infection by *Pythium* spp. on root system morphology of alfalfa seedlings. *Phytopathology* 85:430-435. <http://doi.org/10.1094/Phyto-85-430>
- Mai WF and Mullin PG. 1996. *Plant-parasitic nematodes*. Fifth Edition. A pictorial key to genera. Cornell University Press. 277 p.
- Marks GC and Mitchell JE. 1971. Penetration and infection of alfalfa roots by *Phytophthora megasperma* and the pathological anatomy of infected roots. *Canadian Journal of Botany* 49:63-67. Disponible en línea: <https://vdocuments.site/documents/penetration-and-infection-of-alfalfa-roots-by-phytophthora-megasperma.html>
- Mauza BE and Webster JM. 1982. Suppression of alfalfa growth by concomitant populations of *Pratylenchus penetrans* and two *Fusarium* species. *Journal of Nematology* 14:364-367. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618186/>
- McKenzie JS and Davidson JGN. 1975. Prevalence of alfalfa crown and root diseases in the Peace river region of Alberta and British Columbia. *Canadian Plant Disease Survey* 55:121-125. Disponible en línea: [https://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/cpds-archive/vol55/CPDS\\_Vol\\_55\\_No\\_4\\_\(121-125\)1975.pdf](https://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/cpds-archive/vol55/CPDS_Vol_55_No_4_(121-125)1975.pdf)
- Milano de Tomasel MC and McIntyre GA. 2001. Distribution and biology of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* in alfalfa grown in Colorado. *Nematropica* 31:11-16. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/35224467\\_Distribution\\_and\\_biology\\_of\\_Ditylenchus\\_dipsaci\\_and\\_Aphelenchoides\\_ritzemabosi\\_in\\_alfalfa\\_grown\\_in\\_Colorado](https://www.researchgate.net/publication/35224467_Distribution_and_biology_of_Ditylenchus_dipsaci_and_Aphelenchoides_ritzemabosi_in_alfalfa_grown_in_Colorado)
- Rosas-Hernández L, Ramírez-Suarez A, Alcasio-Rangel S, López-Buenfil JA and Medina-Gómez E. 2017. Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev (Nematoda: Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:377-396. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-8
- SIAP. 2018. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap> (consulta, 22 de Julio de 2018).
- Thorne G. 1961. *Principles of Nematology*. McGraw-Hill Book Company, Inc. 553 p.
- Uddin W. and Knous TR. 1991. *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada. *Plant Disease* 75:51-56. DOI: 10.1094/PD-75-0051
- Velásquez-Valle R. 2001. Geographic and host range of *Meloidogyne* spp. in north central Mexico. *Plant Disease* 85:445. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.445A>
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM y Luna-Ruiz JJ. 2001. Sintomatología y géneros de microorganismos asociados con las pudriciones de la raíz de Chile (*Capsicum annum* L.) en el norte centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219207.pdf>
- Vincelli PC and Herr LJ. 1992. Two diseases of alfalfa caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 and AG-4. *Plant Disease* 76:1283. DOI: 10.1094/PD-76-1283B
- Watanabe T. 1994. *Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC Press, Inc. 411 p.
- Williams-Woodward JL and Gray FA. 1999. Seasonal fluctuations of soil and tissue populations of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* in alfalfa. *Journal of Nematology* 31:27-36. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/67032>
- Wojtowicz MR, Golden AM, Forer LB, and Stouffer RF. 1982. Morphological comparisons between *Xiphinema rivesi* Dalmaso and *X. americanum* Cobb populations from the Eastern United States. *Journal of Nematology* 14:511-516. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/65411/63079>