

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 38, NÚMERO 1, Enero 2020



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

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Editora Técnica * Technical Editor

Dra. Norma Ávila Alistac, UAM-Xochimilco

Composición Web y RMFito * Web and RMFito Composition

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, COLPOS

Ing. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

Editoras Adjuntas * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA

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

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dra. Marja Liza Fajardo Franco, UIEP

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Norma Ávila Alistac, UAM-Xochimilco

Dra. María del Carmen Herrera Rodríguez,
CP-LANREF

Dr. Claudio Rios Velasco, CIAD

Dr. David Espinosa Victoria, COLPOS

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Javier Hernández Morales, COLPOS

Dr. Raymundo Saúl García Estrada, CIAD

Dr. José Francisco Ramírez Dávila, UAEM

Dr. Bulmaro de Jesús Coutiño Estrada, INIFAP

Dr. Hernán García Ruiz, University of Nebraska

Dr. César del Ángel Hernández Galeno, INIFAP

Dr. Raúl Allende Molar, Universidad Veracruzana

Portada: Diversidad morfológica de macroconidios y microconidios asociadas a especies de *Fusarium* spp. aisladas de suelo y raíz en *Agave tequilana* en Los Altos, Jalisco, México.

Original: López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. Pág. 89.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

Relationship between spore fluctuations, environmental conditions and severity of calyx spot on roselle (*Hibiscus sabdariffa*) * Relación entre fluctuaciones de esporas, condiciones ambientales y severidad del manchado y tizón de cáliz de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). 1

Noriega-Cantú DH, Toledo-Aguilar R, Vásquez-Ortiz R, Alejo-Jaimes A, Garrido-Ramírez ER, Pereyda-Hernández J and González-Mateos R.

Identification of daylily rust (*Puccinia hemerocallidis*) and characterization of resistance of five genotypes * Identificación de la roya del lirio de día (*Puccinia hemerocallidis*) y caracterización de la resistencia de cinco genotipos. 25

Sandoval-Sánchez M, Nava-Díaz C, Pérez-Cárcamo J and Sandoval-Islas JS.

Pathosystem *Solanum lycopersicum*-*Phytophthora infestans* in Chapingo, Mexico. Expected, observed and simulated * Patosistema *Solanum lycopersicum*-*Phytophthora infestans* en Chapingo, México. Esperado, observado y simulado 40

Delesma-Morales L, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Pérez JE and Díaz-de la Cruz JB.

Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds * Caracterización morfológica y genética de aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas. 62

Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J and Palemón-Alberto F.

Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana* * Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. 79

López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

Monitoring severity of *Lophodermium* sp. in pine forest with satellite images Sentinel 2 * Monitoreo de la severidad de *Lophodermium* sp. en bosque de pino con imágenes satelitales Sentinel 2. 107

Molina-Serrano JA, Fajardo-Franco ML, Aguilar-Tlatelpa M and Castañeda-Mendoza A.

Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field * Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo. 119
Illa C, Pérez AA, Torassa M and Pérez MA.

Spatial analysis of anthracnose in avocado cultivation in the State of Mexico * Análisis espacial de antracnosis en el cultivo de aguacate en el Estado de México. 132
Tapia-Rodríguez A, Ramírez-Dávila JF, Figueroa-Figueroa DK, Salgado-Siclan ML and Serrato-Cuevas R.

Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum* * Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagonistas a *Sclerotium cepivorum*. 146
Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solís J, Virgen-Calleros G, González-Eguiarte DR, López-Alcocer E and Olalde-Portugal V.

Inhibition of fungal endo-1,3- β -glucanase by phenols isolated from *Turnera diffusa*: an alternative for conventional antifungals * Inhibición de endo-1,3- β -glucanasa fúngica por compuestos fenólicos aislados de *Turnera diffusa*: una alternativa para antifúngicos convencionales. 160
Tapia-Quirós P, Martínez-Téllez MA, Ávila-Quezada GD and Vargas-Arispuro I.

REPORTES FITOPATOLÓGICOS * PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS

CP-Vero 1, white maize (*Zea mays*) synthetic variety resistant to head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*) for Mexican highlands * CP-Vero 1, variedad sintética de maíz (*Zea mays*) blanco, resistente a carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*) para el altiplano de México. 170
De León-García de Alba C.

CP-Hilda 2, new yellow grain synthetic maize (*Zea mays*) variety resistant to horse's tooth (*Claviceps gigantea*) for the Mexican highlands * CP- Hilda 2, nueva variedad sintética de maíz (*Zea mays*) de grano amarillo y resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México. 176
De León-García de Alba C.

Relationship between spore fluctuations, environmental conditions and severity of calyx spot on roselle (*Hibiscus sabdariffa*)

Relación entre fluctuaciones de esporas, condiciones ambientales y severidad del manchado y tizón de cáliz de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

David H. Noriega-Cantú*, Rocío Toledo-Aguilar, Romualdo Vasquez-Ortiz, Antonino Alejo-Jaimes, Campo Experimental Iguala, INIFAP. Carretera Iguala-Tuxpan Km 2.5, Colonia Centro Tuxpan C.P. 40000, Iguala de la Independencia Guerrero; Eduardo R. Garrido-Ramírez, Campo Experimental Centro de Chiapas, INIFAP. Carretera Internacional. Ocozocoautla-Cintalapa Km 3 s/n, Ocozocoautla, Chiapas; Juan Pereyda-Hernández, Ricardo González-Mateos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, UAGro. Periférico Pte. S/N, Colonia Villa de Guadalupe, Iguala, Guerrero, México; C.P. 40010. *Autor para correspondencia: noriega.david@inifap.gob.mx.

Recibido: 17 de Septiembre, 2019.

Aceptado: 09 de Noviembre, 2019.

Noriega-Cantú DH, Toledo-Aguilar R, Vasquez-Ortiz R, Alejo-Jaimes A, Garrido-Ramírez ER, Pereyda-Hernández J and González-Mateos R. 2020. Relationship between spore fluctuations, environmental conditions and severity of calyx spot on roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 1-24.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1909-1

Primera publicación DOI: 26 de Noviembre, 2019.

First DOI publication: November 26, 2019.

Resumen. La jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es afectada por severas enfermedades como tizón y manchado del cáliz (MCJ). El objetivo fue estudiar las relaciones entre fluctuación estacional de esporas de *Corynespora* y *Coniella* patógenos del manchado y tizón de cáliz y hojas, las condiciones de clima y severidad (MCJ) en Ayutla, Gro.,

Abstract. The roselle (*Hibiscus sabdariffa*) is affected by severe diseases such as blight and spotting of the calyx (MCJ). The objective was to study the relationships between seasonal fluctuation of *Corynespora* and *Coniella* spores, pathogenic stains and blight of chalice and leaves, weather conditions and severity (MCJ) in Ayutla, Gro. Mexico. The spores were monitored, in two cycles, the fungi were isolated and the morphological and molecular identification of *Coniella* was performed, the study focused on pathogens reported in Mexico. The pathogenicity tests with *C. diploidiella* and *C. cassiicola* confirmed very similar symptoms between both fungi. *Coniella* was the most abundant (48%) and with least amount *Corynespora* (8.7%). The spore dynamics had a monthly and weather related fluctuation. The population dynamics of spores was closely related to the climate. The maximum and average

México. Las esporas fueron monitoreadas en dos ciclos, se aislaron los hongos y se realizó la identificación morfológica y molecular de *Coniella* el estudio se centró en patógenos reportados en México. Las pruebas de patogenicidad con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* confirmaron la sintomatología muy similar entre ambos hongos. *Coniella* fue el más abundante (48%) y con menos cantidad *Corynespora* (8.7%). La dinámica de esporas tuvo una fluctuación mensual y relacionada con el clima. Las temperaturas máximas y medias (°C) y promedio de radiación global (W/m²) mostraron correlaciones positivas significativas con la abundancia de esporas de *Coniella* y el total de esporas, mientras que la precipitación (mm), temperatura mínima, velocidad del viento máxima (Km hr⁻¹) y horas de radiación solar, sus relaciones fueron negativas con las fluctuaciones de esporas de *Corynespora*. La severidad del manchado de hojas y cálices fue correlacionada positiva y significativa con el número de esporas capturadas.

Palabra clave: *Coniella*, *Corynespora*, epidemiología, dinámica poblacional.

En México se cultivan 18,543.5 ha de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y se producen 7,683.2 t de cálices deshidratados, con un valor de la producción superior a \$ 293 millones de pesos (SIAP, 2018). En dicho país, los estados productores son: Guerrero (14,079 ha), Michoacán (1,714 ha) y Oaxaca (1,605 ha), quienes aportan el 93%, de la producción nacional (SIAP, 2018). En Guerrero, los principales municipios productores son: Ayutla de Los Libres, Tecoaapa, Acapulco de Juárez, San Luis Acatlán, Juan R. Escudero y San Marcos, los que aportaron 64% de la producción nacional en 2018. El sistema de producción maíz-jamaica constituye el eje de la economía de las familias campesinas, el

temperatures (°C) and average global radiation (W/m²) showed significant positive correlations with the abundance of *Coniella* spores and the total spores, while precipitation (mm), minimum temperature, wind speed maximum (Km hr⁻¹) and hours of solar radiation, their relations were negative with the fluctuations of *Corynespora* spores. The severity of leaf and calyx staining was positively and significantly correlated with the number of spores captured.

Key words: *Coniella*, *Corynespora*, epidemiology, population dynamic.

Mexico plants 18,543.5 ha of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and produces 7,683.2 t of dried calyces, with a production value of over \$293 million pesos (SIAP, 2018). In said country, the producing states are Guerrero (14,079 ha), Michoacán (1,714 ha) and Oaxaca (1,605 ha), which supply 93% of the country's production (SIAP, 2018). In Guerrero, the municipal areas with the highest production are Ayutla de Los Libres, Tecoaapa, Acapulco de Juárez, San Luis Acatlán, Juan R. Escudero, and San Marcos, which contributed with 64% of the country's production in 2018. The maize-roselle production system the axis for the economies of farmer families; maize is used as the staple food for the consumption of the families, and roselle, as the commercial crop that provides them with incomes. The "Roselle Calyx Spotting" (RCS) disease, caused by *Corynespora cassiicola*, is considered one of the most severe in Guerrero, since it affects 60% of the total planted surface (Cesavegro, 2018).

However, the fungi *Coniella musaiaensis* var., *hibisci*, *Phomopsis* sp., *Corynespora cassiicola* and *Lasiodiplodia theobromae* are reported in Guerrero as being related to RCS, causing very similar-looking black spots in the calyx and as

maíz se usa como alimento básico de autoconsumo y la jamaica como cultivo comercial para obtención de ingresos económicos. La enfermedad “manchado de cáliz” (MCJ) causada por *Corynespora cassiicola*, es considerada una de las más severas en Guerrero, afecta el 60% de la superficie sembrada (Cesavegro, 2018).

No obstante, se reportan en Guerrero, a los hongos *Coniella musaiaensis* var., *hibisci*, *Phomopsis* sp., *Corynespora cassiicola* y *Lasiodiplodia theobromae* asociados al MCJ, provocando manchas muy similares en el cáliz de color negro, ligeramente hundidas de forma irregular, conforme la infección avanza incrementan en tamaño y número e invaden el cáliz (Martínez, 2010). Correa *et al.* (2011), determinaron que el manchado acuoso del follaje de jamaica en el estado de Tabasco, fue inducido por *Pilidiella diplodiella* (sin. *Phoma diplodiella*) donde causa síntomas con manchas foliares circulares e irregulares color marrón claro, presencia de necrosis con apariencia acuosa en toda la lámina foliar. Conforme avanza la necrosis, se muestran anillos concéntricos marrón claro de consistencia suave; así como, pequeños cuerpos (picnidios) de color marrón oscuro agrupados que sobresalen de la cutícula de la hoja. La necrosis alcanza el peciolo de la hoja, esta se debilita y se desprende de la planta. Las manchas inician en las hojas inferiores y avanzan a las hojas superiores, y cuando el nivel de daño es severo, ocurre defoliación. Mientras que Ortega-Acosta *et al.* (2015) reporta a *Corynespora cassiicola* como agente causal del MCJ en Guerrero, el cual causa manchas circulares irregulares en las hojas con centros de color pajizo, bordes negros y anillos de color púrpura, al crecer se unen en grandes áreas necróticas; en los cálices se observan puntos hundidos necróticos, circulares a irregulares, causando un tizón en el ápice que se extiende a la base del cáliz. Barrón-Coronado *et al.* (2019), en muestras procedentes de Ayutla, reportan

the infection progresses it increases in size and invades the calyx (Martínez, 2010). Correa *et al.* (2011) determined that the aqueous spots on the leaves of roselle plants in the state of Tabasco, was induced by *Pilidiella diplodiella* (syn. *Phoma diplodiella*), which causes symptoms with light brown, circular and irregular spots, necrosis with an aqueous appearance throughout the leaf. As the necrosis progresses, concentric, light brown rings with a soft consistency appear, along with small, grouped, light brown bodies (pycnidia) that stand out of the leaf's cuticle. The necrosis reaches the leaf petiole, which weakens and detaches from the plant. The spots begin with the lower leaves and move upwards until they reach the higher leaves, and when the damage level is severe, defoliation occurs. While Ortega-Acosta *et al.* (2015) report *Corynespora cassiicola* as the causal agent of RCS in Guerrero, causing irregular circular spots on the leaves with light brown colored spots, black edges and purple rings that, when they grow, they join in large necrotic areas; the calyces display sunken necrotic spots, circular to irregular in shape, causing blight in the apex, which extends to the base of the calyx. Barrón-Coronado *et al.* (2019) report the pathogenicity of *Coniella javanica* as the cause of blight in leaves and calyces in samples from Ayutla, describing symptoms with irregular spots, light brown in color, which later increased in size and caused necrosis with the presence of pycnidia; in advanced stages of the disease, an overall wilting of the plant was observed.

The knowledge of the availability and dispersal of the inoculant of the phytopathogen, of the environmental factors that favor the release of spores and the development of the plant are crucial aspects to determine the periods of risk of infection, which may help implement preventive control measures. Therefore, the aim of this investigation was to study the relations between the

la patogenicidad de *Coniella javanica* como el causante del tizón de hojas y cálices, describiendo síntomas con manchas irregulares, de color marrón claro, que luego aumentaron de tamaño y causaron una necrosis con la presencia de picnidios, en etapas avanzadas de la enfermedad, se observó un marchitamiento general de la planta.

El conocimiento de la disponibilidad y dispersión de inóculo de los fitopatógenos, de los factores ambientales que favorecen la liberación de esporas y el desarrollo de la planta, son aspectos fundamentales para determinar los períodos de riesgo de infección, que permita implementar medidas preventivas de control. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue estudiar las relaciones entre fluctuación estacional de esporas de *Corynespora* y *Coniella* hongos patógenos al manchado de cálices y al tizón de hojas y cálices, las condiciones de clima y la severidad del manchado de cálices (MCJ) en Ayutla, Gro. México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El trabajo se realizó en una plantación de jamaica localizada en Pozolapa, Mpio. de Ayutla de los Libres, Guerrero, México (16° 53' 35.2" N, 99° 05' 59.7" O), a una altitud de 275 msnm, con antecedentes de alta incidencia de la mancha acuosa de hojas, tizón cálices y MCJ, durante dos ciclos de producción en primavera-verano 2017 y 2018. El municipio presenta clima cálido subhúmedo (Aw1) (García, 2004). La plantación bajo estudio fue de una hectárea. La siembra se realizó el 04 y 10 de julio de 2017 y 2018 respectivamente, con espeque, con cuatro a seis semillas por mata del genotipo denominado "Coneja", a distancia de 1.0 m entre surcos y matas. Cuando las plantas tuvieron 10 cm de altura, se realizó un raleo, para dejar dos a tres plantas por mata, con una

seasonal fluctuation of *Corynespora* and *Coniella* pathogenic fungi spores to the calyx spotting and leaf and calyx blight, weather conditions and the severity of calyx spotting (RCS) in Ayutla, Gro. Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Area of study. Work was carried out in a roselle plantation located in Pozolapa, in the municipal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico (16° 53' 35.2" N, 99° 05' 59.7" O), at an altitude of 275 masl, with a background of a high incidence of aqueous leaf spotting, calyx slight and RCS during two production cycles in the spring-summer of 2017 and 2018. The municipal area presents a sub-humid warm weather (Aw1) (García, 2004). The plantation under study was of one hectare. Planting was carried out on July 4 and 10, 2017 and 2018 respectively, using a handspike, with four to six seeds per shrub, of the genotype known as "Coneja", at a distance of 1.0 m between furrows and plants. When the plants reached a height of 10 cm, a thinning process was carried out in order to leave two to three plants per shrub, with an approximate density of 25,000 plants ha⁻¹. Fertilization was carried out using the formula 45-30-20 in two applications (Alejo, 2016). No agrochemicals were applied in the plantation for the control of pests and diseases.

Identification of fungi. In 2017, two leaves and two calyces with sunken necrotic spots in the intermediate section of 14 plants were gathered. These plants were cut into 56 fragments of 2.0 mm each, disinfected with sodium hypochlorite at 1.0% for 30 s and rinsed in three successive changes of sterile distilled water and planted in a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium; finally, they were incubated for six days at 26 °C with 12-

densidad aproximada de 25,000 plantas ha⁻¹. La fertilización se realizó con la fórmula 45-30-20 en dos aplicaciones (Alejo, 2016). En la plantación no se aplicaron agroquímicos para el control de plagas y enfermedades.

Identificación de hongos. En 2017 se colectaron dos hojas y dos cálices con manchas irregulares con puntos hundidos necróticos de la parte intermedia de 14 plantas, los cuales se cortaron en 56 fragmentos de 2.0 mm, se desinfectó la superficie con hipoclorito de sodio al 1.0% durante 30 s y se enjuagaron en tres cambios sucesivos de agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), y se incubó durante seis días a 26 °C por 12 horas de fotoperiodo. De estas colonias en crecimiento se obtuvieron 28 subcultivos y se realizaron cultivos monoconidiales por la técnica de rayado en agar al 2%. Luego de seis días se procedió a identificar hasta nivel de género las colonias fungosas obtenidas en cada muestra, empleando las claves Barnett y Hunter (1998).

De los aislamientos realizados se seleccionaron dos colonias de *Phoma*, se purificaron mediante transferencias de puntas de hifas. Para la extracción de ADN se realizaron transferencias a medio líquido papa-dextrosa, se incubaron por 24 horas en agitación y se colectó el micelio. La extracción del ADN se realizó mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983), su concentración, calidad y pureza se cuantificó en un nanodrop One marca Thermo Scientific®, colocando 2 uL de ADN por muestra. Para confirmar la identificación de las cepas, se amplificaron las regiones del espacio transcrito interno (ITS) usando los iniciadores ITS1 / ITS4 (White *et al.*, 1990), las PCR se realizaron con el kit de QIAGEN Top Taq Master mix, en el termociclador Bio-RadT-100®. Las condiciones para la amplificación fueron una etapa inicial de pre-incubación por dos min a 95 °C seguida de 35 ciclos de desnaturalización por

hour photoperiod. From these colonies in growth, 28 subcultures were obtained and monoconidial cultures were carried out using the technique of scratch in agar at 2%. After six days, the fungal colonies of each sample were identified up to the genus level, using the key by Barnett and Hunter (1998).

From the isolations carried out, two *Phoma* colonies were chosen and purified using hyphae tip transfers. For the extraction of DNA, transfers were made to a liquid potato-dextrose medium, incubated for 24 hours while shaking and the mycelium was collected. The DNA extraction was carried out using the method by Dellaporta *et al.* (1983); its concentration, quality and purity was quantified in a nanodrop Thermo Scientific® One, placing 2 uL of DNA per sample. To confirm the identification of the strains, regions of the internal transcribed space (ITS) was amplified, using the primers ITS1 / ITS4 (White *et al.*, 1990). PCRs were carried out using the Top Taq Master mix QIAGEN kit, in the Bio-RadT-100® thermocycler. The conditions for amplification consisted of an initial stage of pre-incubation for two minutes at 95 °C followed by 35 denaturalization cycles for 30 s at 95 °C, hibridation for 30 s at 55 °C and a minute-long extension at 72 °C, and a final extension stage for 10 min at 72 °C (White *et al.*, 1990). The amplified fragments were observed using agarose gel in TAE at 1.0%, stained with GelRed. The fragment of amplified DNA was sent for sequencing in both directions using the method of dideoxynucleotides marked in the 3130 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems®) to the National Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology Laboratory of the Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). The sequences obtained were compared for their identification with a search of sequences in the database of the gene bank of the National

30 s a 95 °C, hibridación por 30 s a 55 °C y extensión por un minuto a 72 °C y una etapa final de extensión durante 10 min a 72 °C (White *et al.*, 1990). Los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante gel de agarosa en TAE al 1.0%, teñidos con GelRed. El fragmento de ADN amplificado se envió a secuenciar en ambas direcciones con el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). Las secuencias obtenidas se compararon para su identificación con una búsqueda de secuencias en las bases de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

Para confirmar la patogenicidad de dos cepas seleccionadas, se utilizaron plantas sanas de Jamaica susceptibles de los genotipos Ayutla y Tecoaapa. La cepa de *C. cassiicola* proveniente de *H. sabdariffa* (MF000878.1) fue obtenida de la colección de micología del Colegio de Postgraduados México (Dr. Javier Hernández-Morales) y la segunda cepa, identificada por morfología como *Phoma*, seleccionada para su identificación con marcadores ITS. Cada cepa se consideró un tratamiento y la unidad experimental fue una planta. Seis plantas por genotipo fueron inoculadas con *C. cassiicola* y otras seis por genotipo con *Phoma* y se usaron tres plantas por genotipo como testigo (aspersión con agua destilada estéril) de 28 días de edad en un bioespacio ubicado en el Campo Experimental Iguala en 2017 (28 °C y 66% de humedad relativa). La inoculación se realizó rociando las hojas sanas con una suspensión de esporas (6×10^7 esporas/mL para *C. cassiicola* y 1×10^7 esporas/mL para *Phoma*). Posteriormente, las plantas se cubrieron durante tres días con una bolsa plástica, desinfectada con

Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

In order to confirm the pathogenicity of two selected strains, healthy yet susceptible roselle plants of genotypes Ayutla and Tecoaapa were used. The *C. cassiicola* strain from *H. sabdariffa* (MF000878.1) was obtained from the mycological collection of the Colegio de Postgraduados Mexico (Dr. Javier Hernández-Morales) and the second strain, identified by morphology as *Phoma*, was chosen for its identification with ITS markers. Each strain was considered a treatment and the experimental unit was a plant. Six plants of every genotype were inoculated with *C. cassiicola*, another six per genotype, with *Phoma*, and three plants were used per genotype as a control (sprayed with sterile distilled water) each one aged 28 days, in a biospace located in the Iguala Experimental Field in 2017 (28 °C and 66% of relative humidity). Inoculation was carried out by spraying the healthy leaves with a spore suspension (6×10^7 spores/mL for *C. cassiicola* and 1×10^7 spores/mL for *Phoma*). Afterwards, the plants were covered for three days using a plastic bag, disinfected with alcohol. In order to maintain a temperature of 28.9 °C and a humidity of 88%, the first 12 leaves were evaluated to determine the incidence of the symptoms. A second inoculation was carried out when the plants were 77 days old; the temperature was 27.3 °C and a relative humidity of 70%, the flower buds were sprayed with a spore suspension (6×10^7 spores/mL for *C. cassiicola* and 10×10^7 spores/mL for *Phoma*) and the control treatment was sprayed with sterile distilled water. The first three calyces of each plant were evaluated. The incidence of the disease was calculated by dividing the number of leaves and calyces with symptoms by the total number of leaves and calyces, multiplied by 100. Evaluations were performed on leaves and calyces 3, 5 and

alcohol, para mantener una temperatura de 28.9 °C y 88% de humedad relativa, se evaluaron las 12 primeras hojas para determinar la incidencia de los síntomas. Una segunda inoculación se realizó a los 77 días de edad de las plantas, la temperatura fue 27.3 °C y 70% humedad relativa, los botones de flor fueron asperjados con una suspensión de esporas (6×10^7 esporas/mL para *C. cassiicola* y 10×10^7 esporas/mL para *Phoma*) y el tratamiento testigo se asperjó con agua destilada estéril, se evaluaron los tres primeros cálices por planta. La incidencia de la enfermedad se calculó dividiendo el número de hojas y cálices con síntomas entre el número total de hojas y cálices multiplicado por 100. Las evaluaciones en hojas y cálices se hicieron a los 3, 8 y 15 días después de la inoculación. Una hoja y cáliz por planta fue sembrado en PDA por tratamiento con la metodología anteriormente descrita y se volvió a aislar de los tejidos con manchas, las colonias y sus estructuras reproductivas, las que se compararon con las características de las colonias inoculadas originalmente.

Muestreo de esporas. En 2017 y 2018, durante julio a noviembre, se capturó y se contaron las esporas presentes en el aire, en la plantación experimental, se utilizó una trampa volumétrica tipo Burckard, la que trabaja mediante un proceso de succión de aire continuo, con un registro de siete días (Gadoury y MacHardy, 1983). La trampa de esporas se colocó en el centro de la plantación, a 1.7 m de altura por encima del dosel de la jamaica. Las esporas succionadas fueron impactadas sobre un tambor cilíndrico, cubierto por una cinta Janel transparente recubierta con vaselina, la cinta fue cortada en secciones de 39.5 mm correspondientes a cada período de 24 horas y montada sobre un portaobjetos. El conteo de esporas fue en tres transectos a 400x de aumento, calculando el promedio observado por 24 h. Cuando menos de cinco esporas

8 days after inoculation. One leaf and calyx from each plant per treatment were planted in PDA using the method described above, and re-isolated it from the tissues with spots, the cultures and their reproductive structures, which were compared with the characteristics of the cultures inoculated originally.

Sampling of spores. From July to November, 2017 and 2018, spores present in the air were captured and counted in the experimental plantation; a Burckard volumetric trap was used, which works with a continuous air suction process, with a record of seven days (Gadoury and MacHardy, 1983). The spore trap was placed in the center of the plantation, 1.7 m above the roselle canopy. The spores drawn in hit a cylindrical drum, covered by Janel sticky tape covered in Vaseline. The tape was cut into 39.5 mm sections, one for each 24-hour period, and placed on a slide. The spore count was in three transects at 400x magnification, calculating the average observed during 24 h. At least five spores were observed, another three transects were counted and the average was calculated to report the concentration of spores accumulated in seven days. Spores were monitored for 133 and 122 days in 2017 and 2018 respectively, and in the phenological stages of growth, development of flower buds, fruition and before harvest.

Weather measurements. The weather factors of rainfall, relative humidity, global radiation and wind speed were recorded in a Davis Vantage PRO2 weather station from July to December in 2017 and 2018 respectively. Using the records of global radiation, the number of sunlight hours per day were recorded.

Monitoring the disease severity. The level of damage by the disease was determined in 25 plants

fueron observadas, otros tres transectos fueron contados y se calculó el promedio; para reportar la concentración de esporas acumuladas en siete días. El monitoreo de esporas se realizó durante 133 y 122 días en 2017 y 2018 respectivamente, en las etapas fenológicas de crecimiento vegetal, desarrollo de yemas florales, fructificación y previo a cosecha.

Mediciones meteorológicas. Los factores climáticos de precipitación, temperatura, humedad relativa, radiación global y velocidad del viento se registraron en una estación meteorológica Davis Vantage PRO2, desde julio a diciembre, en 2017 y 2018 respectivamente. Con los registros radiación global se estimó el número de horas con luz solar por día.

Monitoreo de la severidad de la enfermedad. El nivel de daño de la enfermedad se determinó en 25 plantas seleccionadas al azar, en cada una se seleccionó una hoja y cáliz por rama de la base, intermedia y superior de la planta por punto cardinal, contabilizando 12 hojas y cálices por planta y con una escala diagramática de Ortega-Acosta *et al.* (2016), con rango de 0 al 5, en hoja 0=sano (0% de daño) y 5=daño severo (>57% de daño); en cáliz 0=sano (0% de daño) y 5=daño severo (>77% de daño) para determinar la severidad. El periodo de evaluación para hojas fue en septiembre previo a la emergencia de flores y para cálices en noviembre antes de la cosecha de 2017 y 2018.

Análisis estadístico. Los registros de captura de esporas se agruparon en periodos de siete días y se analizaron con estadísticas descriptivas y la correlación de Spearman (SAS, 2010) entre densidad de esporas acumuladas semanalmente y datos de clima. También se utilizó la correlación de Spearman para relacionar la cantidad de esporas acumuladas semanalmente con severidad de la enfermedad en hojas y cálices.

chosen at random. In each one, a leaf and a calyx were chosen per branch on the lower, intermediate and lower sections of the plant, per cardinal point, counting 12 leaves and calyces per plant and with a diagrammatic scale by Ortega-Acosta *et al.* (2016), with a range of 0 to 5; in leaves 0=healthy (0% damage) and 5= severe damage (>57% damage); in calyces 0=healthy (0% damage) and 5= severe damage (>77% damage) to determine the severity. The evaluation period for leaves was in September before the emergence of flowers, and for flowers and calyces, in November, before harvesting in 2017 and 2018.

Statistical analysis. The spore capture records were grouped in seven-day periods and analyzed with descriptive statistics and the Spearman correlation (SAS, 2010) between spores accumulated every week and weather data. The Spearman correlation was also used to relate the number of spores accumulated every week with the severity of the disease in leaves and calyces.

RESULTS

Identification of fungi. A white mycelial growth later turned gray, eight days later formed hyalin-colored pycnidial conidiomaths, which then turned dark brown and round, covering the Petri dish. The conidiophores were very dense, thin, simple and sometimes branched. The immature hyalin spores were unicellular, elliptical, they later turned light brown, smooth, ellipsoidal, and measured 10-16.2x 5-7 μm , characteristics which place them in the genus *Phoma* (Barnett and Hunter (1998). Two representatives were placed in the Collection of Phytopathogenic Fungi of the Phytopathology Lab, Campo Experimental Centro de Chiapas, CIRPAS-INIFAP, as Gro-1701 and Gro-1702. The DNA sequencing of this strain had a similarity of 99%

RESULTADOS

Identificación de hongos. Un crecimiento de micelio color blanco que se tornó grisáceo, a los ocho días estas colonias formaron conidiómatas picnidiales de color hialino y posterior color marrón oscuro de forma redonda cubriendo la caja Petri. Los conidióforos muy densos, delgados, simples y a veces ramificados. Las esporas inmaduras hialinas unicelulares, elípticos, posteriormente color marrón claro, lisas, elipsoidales, de 10-16.2x 5-7 µm características que los ubican dentro del género *Phoma* (Barnett y Hunter (1998)). Dos aislados representativos se depositó en la Colección de Cultivos de Hongos Fitopatógenos en el Laboratorio de Fitopatología, Campo Experimental Centro de Chiapas, CIRPAS-INIFAP, como Gro-1701 y Gro-1702. La secuenciación de ADN de ésta cepa tuvo 99% de similitud con *Coniella diplodiella* (= *Phoma.diplodiella*) (KC771899.1).

El segundo crecimiento de micelio septado con conidióforos cilíndricos cortos y conidios terminales individuales o en cadenas cortas con formación acropetala, color café, multicelulares, con exospora gruesa incolora y una prominente cicatriz oscura, características que coinciden con el género *Corynespora* (Barnett y Hunter, 1998). El tercer crecimiento micelial fue rápido y abundante, en 1 a 3 días, de color gris a oliváceo, conidiomas picnidiales se observaron después de 13 días, de color negro, obpiriformes, ostiolados, con conidios hialinos inmaduros a los 17 días, elipsoidales a subovoides, a los 22 días se observaron los conidios maduros de color café oscuro, elipsoidales a ovoides y con estriaciones longitudinales irregulares características morfológicas que coinciden con el género *Lasiodiplodia* (Sutton, 1980; Barnett y Hunter, 1998).

De tejido enfermo, en hojas, los hongos *Coniella* sp. y *Corynespora* sp. mostraron la más alta frecuencia de aislamientos con 71.4 y 21.4%

with *Coniella diplodiella* (= *Phoma.diplodiella*) (KC771899.1).

The second growth of septated mycelia short, cylindrical conidiophora and conidia, either individual, terminal or short-chained conidia, with a brown acropetal formation, multicellular, with a thick, colorless exospore and a dark, prominent scar, characteristics coincide with the genus *Corynespora* (Barnett and Hunter, 1998). The third mycelial growth was fast and abundant, in 1 to 3 days, colored gray to olive greenish, with pycnidial conidiomes that appeared after 13 days, black in color, obpiriform, ostiolated, with ellipsoidal to sub-ovoidal, immature hyaline conidia after 17 days; after 22 days, we observed mature, dark brown, ellipsoidal to ovoidal conidia with longitudinal and irregular striations, morphological characteristics that coincide with the genus *Lasiodiplodia* (Sutton, 1980; Barnett and Hunter, 1998).

The fungi *Coniella* sp. y *Corynespora* sp. Displayed the highest frequency of diseased tissue in leaves isolations with 71.4 and 21.4% respectively, and in calyces, both fungi, with 57.1 and 35.7% respectively (Table 1). The fungus with the least isolation was *Lasiodiplodia* sp., which was isolated with a low frequency in leaves and calyces, with 7.1%.

The fungus *C. diplodiella* caused the typical RCS symptoms in the Ayutla and Tecopanapa genotypes, with 88.9 and 22.2% of symptoms in leaves and calyces of the plants, respectively. The fungus *C. cassicola* also caused similar RCS symptoms in both genotypes, with 56.3 and 25% of symptoms in leaves and calyces. With both fungi, the symptoms on leaves began with irregular spots and the formation of a red halo and a necrotic center measuring 1-3 mm at 72 and 192 h after inoculation with *C. diplodiella* and *C. cassicola* respectively. The calyces displayed slightly sunken black spots, irregularly shaped, with a diameter

respectivamente y en cálices, ambos hongos con 57.1 y 35.7% respectivamente (Cuadro 1). El de menor aislamiento fue *Lasiodiplodia* sp. se aisló con baja frecuencia en hojas y cálices de 7.1%.

El hongo *C. diplodiella* causó los síntomas típicos del MCJ en los genotipos Ayutla y Tecoaapa, con 88.9 y 22.2% de síntomas en hojas y cáliz de las plantas respectivamente. El hongo *C. cassiicola* también causó síntomas similares de MCJ en ambos genotipos, con 56.3 y 25% de síntomas en hojas y cálices. Con ambos hongos, los síntomas en hojas iniciaron con manchas irregulares y la formación de un halo rojo y centro necrótico de 1-3 mm, a las 72 y 192 h después de la inoculación con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* respectivamente. En cáliz se presentaron las manchas de color negro ligeramente hundidas, de forma irregular de aproximadamente 1-2 mm de diámetro a los 53 y 91 días después de la segunda inoculación con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* respectivamente. Sin embargo, en hojas, el aislamiento de *C. diplodiella* fue más agresivo al causar mayor incidencia en el genotipo Tecoaapa y Ayutla, mientras que *C. cassiicola* tuvo una menor incidencia e incluso hubo tres plantas del genotipo Ayutla que no mostraron síntomas. En contraste, en el cáliz la incidencia de la enfermedad fue ligeramente mayor, *C. cassiicola* con una incidencia del 25.0% y *C. diplodiella* fue de 22.2%. La infección de la hoja y cáliz fue confirmada con estos aislamientos, volviendo a re-aislar los dos hongos de las manchas típicas.

Muestreo de esporas. Del muestreo de esporas en el aire se identificaron cinco géneros de hongos por sus características morfológicas: *Coniella*, *Corynespora*, *Lasiodiplodia*, *Curvularia* y *Alternaria* (Barnett y Hunter 1998). Los géneros *Curvularia*, *Alternaria* y *Lasiodiplodia* tienen habilidades patogénicas reconocidas en numerosos hospedantes. *Lasiodiplodia* fue reportada en cálices frescos de

Cuadro 1. Frecuencia de aislamientos en hoja y cáliz de jamaica con síntomas de manchado. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los libres, Guerrero, México. 2017.

Table 1. Frequency of isolation in roselle leaves and calyces with symptoms of spotting. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los libres, Guerrero, Mexico. 2017.

Tipo de espora	Frecuencia en hoja (%)	Frecuencia en cálices (%)
<i>Coniella</i> sp.	71.4	57.1
<i>Corynespora</i> sp.	21.4	35.7
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	7.1	7.1

of approximately 1-2 mm on days 53 and 91 after the second inoculation with *C. diplodiella* and *C. cassiicola* respectively. However, the *C. diplodiella* isolation was more aggressive on leaves, since it caused a greater incidence on the Tecoaapa and Ayutla genotype, whereas *C. cassiicola* had a lower incidence and there were even three plants of the Ayutla genotype that displayed no symptoms. By contrast, the incidence of the disease in the calyx was slightly higher, since *C. cassiicola* had an incidence of 25.0% and *C. diplodiella*, it was 22.2%. The infection of leaves and calyces was confirmed with these treatments when re-isolating the two fungi from the typical spots.

Spore sampling. From the sample of spores in the air, five genera were identified using their morphological characteristics: *Coniella*, *Corynespora*, *Lasiodiplodia*, *Curvularia* and *Alternaria* (Barnett and Hunter 1998). The genera *Curvularia*, *Alternaria* and *Lasiodiplodia* have pathogenic abilities, recognized in several hosts. *Lasiodiplodia* was reported in fresh roselle calyces by Martínez (2010), while Ruiz (2014) reported *Alternaria* in dried calyces. However, in the ethiology of the spotting of roselle calyces, the presence and pathogenicity of *Pilidella* (= *Coniella*) *diplodiella* (Correa et al., 2011), *Coniella javanica*

jamaica por Martínez (2010) mientras que Ruíz (2014) reportó *Alternaria* en cálices deshidratados. No obstante, en la etiología del manchado de cálices de jamaica, ha sido consistente la presencia y patogenicidad de *Pilidella* (= *Coniella*) *diploidiella* (Correa *et al.*, 2011), *Coniella javanica* (Barrón *et al.*, 2019) y *Corynespora cassiicola* (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Por tal razón el estudio se centró a éstos patógenos.

En el Cuadro 2 se presenta la abundancia de esporas desde la siembra a la cosecha. El género *Coniella*, con 19.3 y 32.3 esporas/semana en 2017 y 2018 respectivamente (con un máximo de 223.6 esporas/semana del 19 al 25 de septiembre 2018). Con una detección de 44.4 y 52.0% para 2017 y 2018 respectivamente y promedio de 48.2% en ambos ciclos. El género *Corynespora* con menores concentraciones de 3.9 y 5.3 esporas/semana en 2017 y 2018 (con un máximo de 12.4 esporas/semana del 24 al 30 de noviembre 2018). Con una detección de 9.0 y 8.5% en 2017 y 2018 respectivamente y promedio de 8.7% en ambos ciclos. Las esporas de *Lasiodiplodia* fueron menos abundantes y con bajo porcentaje de detección en ambos ciclos.

Mediciones meteorológicas. La precipitación más alta fue de 141.2 mm el 14 de septiembre 2017 y

(Barrón *et al.*, 2019) and *Corynespora cassiicola* (Ortega-Acosta *et al.*, 2015) have been consistent. This is the reason why this study was focused on these pathogens.

Table 2 shows the abundance of spores from planting to harvest. The genus *Coniella* displayed 19.3 and 32.3 spores/week in 2017 and 2018 respectively (with a maximum of 223.6 spores/week from September 19 to 25, 2018), with a detection rate of 44.4 and 52.0% for 2017 and 2018 respectively, and an average of 48.2% in both cycles. The genus *Corynespora* displayed lower concentrations, with 3.9 and 5.3 spores/week in 2017 and 2018 (with a maximum of 12.4 spores/week from November 24 to 30, 2018), with a detection rate of 9.0 and 8.5% in 2017 and 2018 respectively, and an average of 8.7% in both cycles. The *Lasiodiplodia* spores were less abundant and with a low detection rate in both cycles.

Weather measurements. The highest rainfall levels were 141.2 mm on September 14, 2017 and 71.9 mm on October 10, 2018 (Table 3). The highest temperatures occurred in 2018, with an average of 32.7 °C, whereas in 2017 it was 31.9 °C. The lowest temperature occurred in 2018 with 14.9 °C, and in 2017, it was 15.8 °C. The highest

Cuadro 2. Abundancia y porcentaje de detección de esporas promedio por semana, en el sistema de producción de jamaica. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los Libres, Guerrero, México.
Table 2. Average abundance and percentage of detection of spores per week in the roselle production system. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico.

Hongo	Primer ciclo 2017		Segundo ciclo 2018		Promedio 2017-2018 (%)
	Abundancia ^z	%	Abundancia	%	
<i>Coniella</i>	19.3	44.3	32.3	52.0	48.2
<i>Corynespora</i>	3.9	9.0	5.3	8.5	8.7
<i>Lasiodiplodia</i>	2.1	4.8	1.5	2.4	3.7
<i>Curvularia</i>	13.2	30.4	18.9	30.3	30.3
<i>Alternaria</i>	5.0	11.5	4.2	6.8	9.1
Total	43.5	100	62.2	100	100

^z Periodo de julio a noviembre / ^z Period between July and November.

de 71.9 mm el 10 de octubre 2018 (Cuadro 3). Las temperaturas máximas se presentaron en 2018, con una media de 32.7°C mientras que en 2017 fue de 31.9°C. La menor temperatura se presentó en 2018 con 14.9°C y en 2017 fue de 15.8°C. La mayor radiación global que fue de 600.5 W/m² se presentó el 11 de agosto de 2018 y de 553.7 W/m² el 31 de julio de 2017. El mayor rango de velocidad del viento alcanzó hasta 3.2 km hr⁻¹ en 2017, mientras que en 2018 fue de 2.7 km hr⁻¹. La media de humedad relativa fue de 86.4 y 84.4% en 2017 y 2018 respectivamente.

Distribución temporal de inóculo en el aire. La captura de esporas dentro del sitio de estudio en el periodo de julio a noviembre de 2017 y 2018, mostró presencia de *Coniella* y *Corynespora* durante todo el ciclo del cultivo (Figura 1). La detección de esporas fue a partir de la emergencia de las primeras hojas verdaderas en las plantas de jamaica y continuó hasta la cosecha, observándose clara variación mensual.

En julio de 2017, a los 10 días después de la siembra, se registró la presencia de esporas de *Coniella* y *Corynespora* con un promedio de 20 y 4.5 esporas/semana respectivamente. En el desarrollo

global radiation, of 600.5 W/m², took place on August 11, 2018 and 553.7 W/m² on July 31, 2017. The highest wind speed range reached up to 3.2 km hr⁻¹ in 2017, and in 2018, it was 2.7 km hr⁻¹. Mean relative humidity was 86.4 and 84.4% in 2017 and 2018, respectively.

Seasonal distribution of inoculant in the air.

The capture of spores in the study area in the period between July and November, 2017 and 2018, displayed the presence of *Coniella* and *Corynespora* during the entire planting cycle (Figure 1). The detection of spores began with the emergence of the first true leaves in roselle plants and it continued until the harvest, with the observation of a clear monthly variation.

In July, 2017, 10 days after planting, we registered the presence of *Coniella* and *Corynespora* spores, with an average of 20 and 4.5 spores/week, respectively. During vegetative development, the population levels of both fungi were reduced. *Coniella*, with an average of 0.7 spores/week between August 25 and October 13, 2017, and of 0.2 spores/week between August 29 and September 11, 2018. *Corynespora* presented slightly higher populations, with an average of 1.9 spores/week

Cuadro 3. Rango y promedio diario de variables climáticas del 01 de julio al 10 de diciembre, de los años 2017 y 2018. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los Libres, Guerrero, México.

Table 3. Range and daily average of weather variables between July 01 and December 10, 2017 and 2018. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico.

Variables climáticas	2017		2018	
	Rango	Media	Rango	Media
Precipitación (mm)	0-141.2	10.4	0-71.9	4.8
Temperatura máxima (°C)	22.1-36.8	31.9	21.5-36.2	32.7
Temperatura mínima (°C)	15.8-22.7	20.5	14.9-22.4	19.5
Temperatura media (°C)	21.2-28.1	24.9	20.2-28.7	25.8
Radiación global promedio (W/m ²)	40.9-553.2	436.1	61.4-600.5	460.9
Velocidad Viento promedio (Km h ⁻¹)	0.0-3.2	1.2	0.24-2.7	1.4
Humedad Relativa (%)	52.5-99.4	86.4	67.8-99.8	84.4

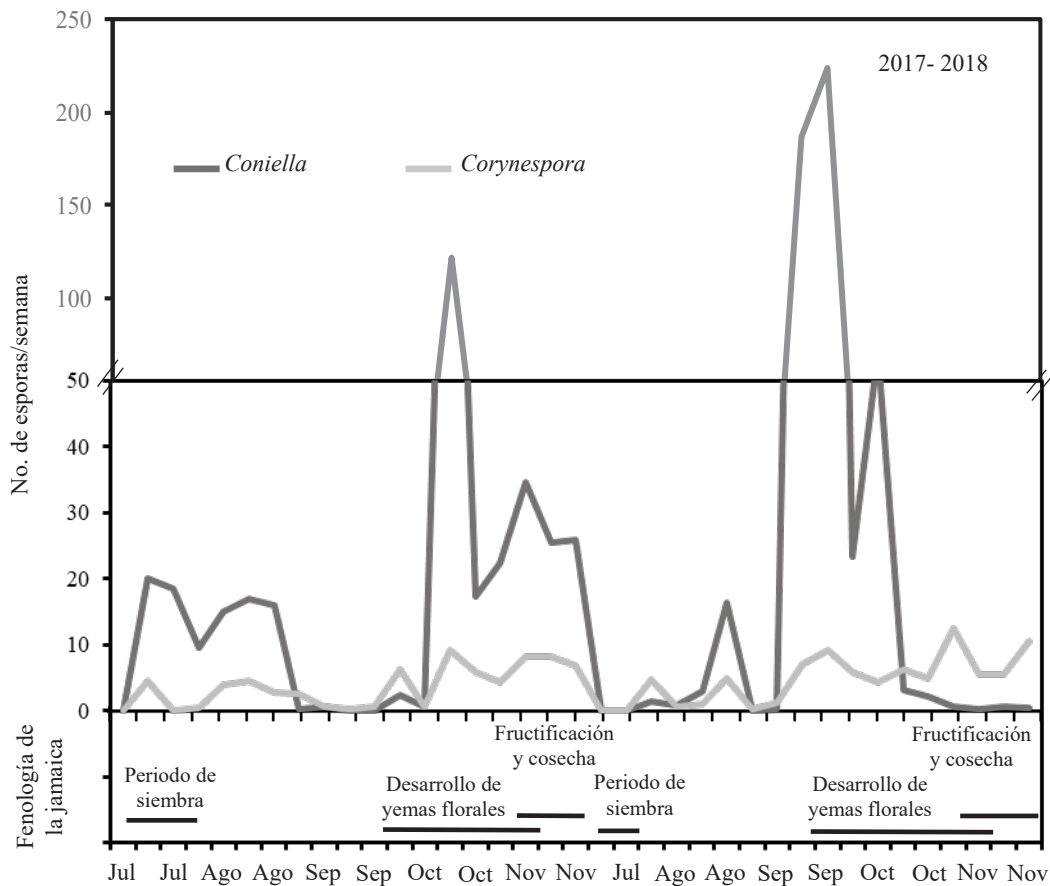


Figura 1. Distribución semanal de esporas de *Coniella* y *Corynespora* presentes en el aire, desde julio hasta noviembre de 2017 y 2018. La fenología de la jamaica se muestra en la parte inferior. Los periodos típicos de siembra, floración y cosecha en Guerrero se indican con líneas negras.

Figure 1. Weekly distribution of *Coniella* and *Corynespora* spores in the air, from July to November, 2017 and 2018. The phenology of roselle is shown below. The typical planting, flowering and harvesting periods in Guerrero are indicated with black lines.

vegetativo, ambos hongos, bajaron sus niveles poblacionales. *Coniella* con 0.7 esporas/semana en promedio, del 25 de agosto al 13 de octubre de 2017 y 0.2 esporas/semana en promedio entre el 29 de agosto al 11 de septiembre de 2018. *Corynespora* presentó poblaciones un poco más altas con 1.9 esporas/semana en promedio entre el 25 de agosto al 13 de octubre de 2017 y 0.7 esporas/semana en promedio entre el 29 de agosto al 11 de septiembre de 2018. Sin embargo, durante el desarrollo de yemas florales, fructificación y madurez fisiológica

between August 25 and October 13, 2017, and of 0.7 spores/week between August 29 and September 11, 2018. However, during the development of flower buds, the fruition and physiological maturity of calyces increased their population levels. *Coniella*, with an average of 41.2 spores/week between October 13 to November 24, 2017, and of 49.5 spores/week between September 12 and November 30, 2018. Meanwhile, *Corynespora* registered lower population averages, with 7.1 spores/week between October 13 and November

de cálices incrementaron sus niveles poblacionales. *Coniella* con 41.2 esporas/semana en promedio del 13 de octubre al 24 de noviembre de 2017 y 49.5 esporas/semana en promedio desde el 12 de septiembre al 30 de noviembre 2018. Mientras que *Corynespora* registró poblaciones promedio más bajas con 7.1 esporas/semana del 13 de octubre al 24 de noviembre de 2017 y 7.2 esporas/semana del 12 de septiembre al 30 de noviembre de 2018.

Correlación entre esporas y clima. Las concentraciones de captura de esporas de los hongos fueron correlacionadas con las variables meteorológicas mediante la prueba de Spearman y los valores se presentan en el Cuadro 4. Las poblaciones individuales de esporas de los cinco géneros estudiados y el total de esporas mostraron sensibilidad a las variaciones climáticas. La lluvia indujo un efecto negativo significativo solamente para la concentración de inoculo de *Corynespora*. La temperatura

24, 2017, and 7.2 spores/week between September 12 and November 30, 2018.

Correlation between spores and weather.

The concentrations of captures of fungal spores were correlated with the weather variables using Spearman's test, and the values are shown in Table 4. The individual spore populations from the five genera studied, along with the total of spores, displayed sensitivity to weather variations. Rainfall led to a significant negative effect only on the concentration of the *Corynespora* inoculant. Temperature was the variable that favored the dynamics of fungi population in the air the most. The highest temperature showed a significant positive correlation with the fluctuations in population of *Coniella* and *Curvularia* inoculants and the total of spores, whereas *Alternaria* displayed a negative correlation, and the minimum temperature, only with the dynamics of the *Corynespora* population.

Cuadro 4. Coeficiente de correlación de Spearman entre concentración de esporas acumulada semanalmente y variables meteorológicas. Ciclos 2017-2018. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los Libres, Guerrero, México.

Table 4. Spearman correlation coefficient between the concentration of spores accumulated weekly and weather variables. Ciclos 2017-2018. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico.

Hongo	PP ^y	Tmax	Tmin	Tmed	VVmax	RGprom	HRG
<i>Coniella</i>	-0.3009 ^z 0.0837 [*]	0.3957	-0.0512	0.4976	-0.1500	0.41278	0.0002
<i>Corynespora</i>	-0.4259 0.0120	0.0120	-0.3631	0.0178	-0.3553	-0.03883	-0.5536
<i>Lasiodiplodia</i>	-0.1513 0.3930	0.1353	-0.0903	0.1047	0.2997	0.12448	0.0940
<i>Curvularia</i>	-0.2682 0.1251	0.3408	-0.0785	0.4318	-0.1039	0.38521	0.0104
<i>Alternaria</i>	-0.0492 0.7824	-0.3526	0.0019	-0.2675	0.1998	-0.20753	0.0694
Total de esporas	-0.3184 0.0665	0.3451	-0.0780	0.4521	-0.1220	0.3839	-0.0108
		0.0457	0.6611	0.0073	0.4920	0.025	0.9518

^y PP=precipitación (mm); Tmax=temperatura máxima (°C); Tmin=temperatura mínima; Tmed=temperatura promedio; VVmax=velocidad del viento máxima (km hr⁻¹); RGprom=radiación global promedio(W/m²) y HRG=horas de radiación global / ^y PP=rainfall (mm); Tmax=maximum temperature (°C); Tmin=minimum temperature; Tmed=mean temperature; VVmax=maximum wind speed (km hr⁻¹); RGprom=mean global radiation (W/m²) and HRG=hours of global radiation.

^z Coeficiente de correlación; * Nivel de significancia; número de observaciones 34 / ^z Correlation coefficient; * Level of significance; number of observations 34.

fue la variable que más favoreció la dinámica de población de los hongos en el aire. La temperatura máxima mostró una correlación positiva significativa con las fluctuaciones poblacionales de inóculo de *Coniella* y *Curvularia* y el total de esporas, mientras que *Alternaria*, presentó correlación negativa. Y la temperatura mínima con una correlación negativa significativa solamente con la dinámica de población de *Corynespora*. La temperatura diaria promedio manifestó una correlación positiva con la fluctuación de esporas de *Coniella* y *Curvularia* y el total de esporas. De la misma manera, la velocidad máxima del viento se correlacionó negativamente con la cantidad de esporas de *Corynespora*. En este estudio la radiación global fue otra variable con influencia en la dinámica de población de hongos en el aire, la radiación global promedio mostró una influencia positiva sobre la dinámica de población de *Coniella* y *Curvularia* y el total de esporas, mientras que el número de horas de radiación solar mostraron una influencia negativa con las esporas de *Corynespora*.

Correlación entre severidad de MCJ y esporas de *Coniella* y *Corynespora*. En 2017, la severidad del MCJ en las hojas alcanzó un índice de 2.6, en septiembre y la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fue de 121.2 y 9.1 esporas/semana respectivamente, en la última semana de este mes (Figura 2a); en septiembre se presentó la más alta precipitación acumulada de 936.6 mm. La severidad de la enfermedad en los cálices alcanzó un índice de 3.9 en noviembre, la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fueron de 34.7 y 8.3 esporas/semana respectivamente, en la segunda semana de noviembre (Figura 2a); en la cuarta semana de octubre a la tercera semana de noviembre se presentó una precipitación acumulada de 9.7 mm. En 2018, la severidad del MCJ en las hojas fue alta, con 3.2 de la escala, en septiembre

The average daily temperature displayed a positive correlation with the fluctuation of *Coniella* and *Curvularia* spores and the total of spores. Likewise, the maximum wind speed had a negative correlation with the amount of *Corynespora* spores. In this study, global radiation was another variable that had an influence on the dynamics of the population of fungi in the air; average global radiation presented a positive influence on the dynamics of the *Coniella* and *Curvularia* populations and the total spores, while the number of hours of solar radiation displayed a negative influence with the *Corynespora* spores.

Correlation between the severity of RCS and *Coniella* and *Corynespora* spores. In September 2017, the severity of the RCS in leaves reached an index of 2.6 and the concentration of *Coniella* and *Corynespora* spores was 121.2 and 9.1 spores/week, respectively, in the last week of said month (Figure 2a). The highest accumulated rainfall level was 936.6 mm and occurred in September. The disease severity in the calyces reached an index of 3.9 in November, and the concentrations of *Coniella* and *Corynespora* was 34.7 and 8.3 spores/week, respectively, in the second week of November (Figure 2a), whereas between the second week of October and the third week of November, accumulated rainfall was 9.7 mm. In 2018, the severity of RCS in leaves was high, with 3.2 on the scale in September, and the concentration of *Coniella* and *Corynespora* spores was higher, with 223.6 and 9.1 spores/week, respectively, in the last week of said month (Figure 2b); in September, there was an accumulated rainfall of 48.3 mm. The severity of the disease in the calyces reached an index of 3.55 in November, whereas the concentrations of *Coniella* and *Corynespora* spores were 0.6 and 12.4 spores/week, respectively, in the third week of November (Figure 2b). The time

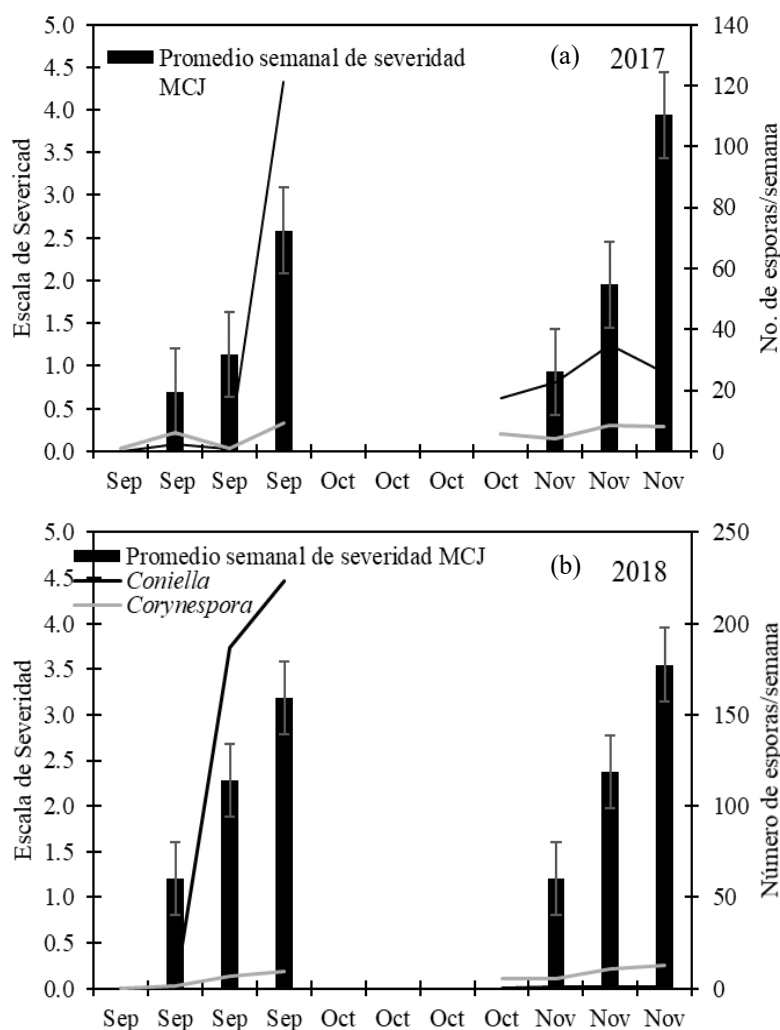


Figura 2. Promedio de severidad semanal del manchado de hoja (septiembre) y cáliz (noviembre) en jamaica (MCJ) estimada con la escala de 0 al 5, donde 0=sano y 5=daño severo en plantas no tratadas en 2017 (a) y 2018 (b). Número de esporas por semana de *Coniella* y *Corynespora* atrapadas en la parcela por una trampa de esporas volumétrica de Burkard. Las barras verticales representan errores estándar.

Figure 2. Mean weekly severity of leaf (September) and calyx spotting (November) in roselle (RCS) estimated on a scale of 0 to 5, where 0=healthy and 5=severe damage to untreated plants in 2017 (a) and 2018 (b). Number of *Coniella* and *Corynespora* spores per week trapped in the field using a Burkard volumetric spore trap. Vertical bars represent standard errors.

y la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fue más alta con 223.6 y 9.1 esporas/semana respectivamente, en la última semana de este mes (Figura 2b); en septiembre se presentó una precipitación acumulada de 48.3 mm. La severidad de la enfermedad en los cálices alcanzó

period lasting from the third week in October to the first week in November displayed accumulated rainfalls of 261.7 mm.

The variations in severity of the RCS disease displayed a high correlation with the fluctuations in populations of *Coniella* and *Corynespora*

un índice de 3.55 en noviembre, la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fueron de 0.6 y 12.4 esporas/semana respectivamente, en la tercera semana de noviembre (Figura 2b); de la tercera semana de octubre a la primera semana de noviembre se presentaron precipitaciones acumuladas de 261.7 mm.

Las variaciones de severidad de la enfermedad MCJ mostraron alta correlación con las fluctuaciones de población de esporas de *Coniella* y *Corynespora* y en el total de esporas (Cuadro 5). La correlación entre la severidad de la enfermedad en las hojas del estrato base de la planta (evaluadas en septiembre) y el número acumulado de esporas de *Coniella* y *Corynespora* y el total de esporas fue positiva y significativa para ambos años. En el estrato medio y superior de la planta se evaluó la severidad de la enfermedad en cálices y se correlacionó positivamente con las poblaciones de esporas de *Corynespora* y con el total de esporas en el aire.

DISCUSIÓN

El estudio sobre dinámica de las esporas presentes en el aire es importante para comprender el patrón de distribución espacial y temporal del inóculo de los patógenos, para proponer estrategias de manejo integrado de las enfermedades.

Identificación de hongos. En este trabajo, el género *Coniella* (= *Pilidiella*) fue el más frecuente en el cultivo y abundante en el aire, mientras que *Corynespora* tuvo una menor frecuencia en el cultivo y en el muestreo del aire. *Lasiodiplodia* con mucha menor frecuencia y abundancia sobre el cultivo. En cambio, las esporas de *Curvularia* y *Alternaria* fueron abundantes en el aire, en el caso de *Curvularia* ha sido asociada al MCJ (Trujillo-Tapia y Ramírez-Fuentes, 2015). No obstante, el estudio

Cuadro 5. Correlación de Spearman entre severidad del manchado del cáliz de jamaica y la concentración de esporas acumuladas semanalmente. Pozolapa, Mpio. de Ayutla de los Libre, Guerrero, México.

Table 5. Spearman correlation between the severity of the rosette calyx spotting and the concentration of spores accumulated weekly. Pozolapa, Mpio. area of Ayutla de los Libre, Guerrero, Mexico.

Hongo	Estratos de la planta ^x		
	Base	Medio	Superior
<i>Coniella</i>	0.56423^y	0.51853	0.50442
	0.0228[*]	0.0841	0.0945
	16^z	12	12
<i>Corynespora</i>	0.76691	0.70424	0.66199
	0.0005	0.0106	0.019
	16	12	12
Total de esporas	0.68794	0.61269	0.58452
	0.0032	0.0342	0.0459
	16	12	12

^x Base=evaluación de severidad en hojas en septiembre; Medio y Superior=evaluación severidad en cálices en noviembre / Base=evaluation of severity on leaves in September; Mean and higher =evaluation of severity on calyces in November.

^y Coeficiente de correlación; ^{*} Nivel de significancia y ^z Número de observaciones / Correlation coefficient; ^{*} Level of significance and ^z Number of observations.

spores, as well as in the total of spores (Table 5). The correlation between the severity of the disease on the leaves of the lower section of the plant (evaluated in September) and the accumulated number of *Coniella* and *Corynespora* spores and the total of spores was positive and significant for both years. In the middle and top sections of the plant, the severity of the disease was evaluated in calyces and correlated positively with the populations of *Corynespora* spores and with the total of spores in the air.

DISCUSSION

The study on the dynamics of spores present in the air is important to understand the spatial and

se centró en los géneros *Coniella* y *Corynespora*, debido a que han sido reportados consistentemente como agentes patógenos en jamaica con las especies *P.* (= *Coniella*) *diplodiella*, como causante de mancha acuosa en hojas y defoliación de la planta (Correa *et al.*, 2011), *C. javanica* causante del tizón de las hojas, cálices y un marchitamiento general de la planta (Barrón-Coronado *et al.*, 2019) y *Corynespora cassiicola* reportado como agente causal del manchado de cáliz con puntos circulares a irregulares hundidos necróticos, causando un tizón del ápice a la base del cáliz y en hojas manchas circulares a irregulares con centros de color pajizo, bordes negros y anillos púrpuras que al unirse forman áreas necróticas (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Las pruebas de patogenicidad realizadas con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* confirmaron sintomatología muy similar entre ambos hongos.

Clima y patógenos. Las esporas de *Coniella* y *Corynespora* fueron atrapadas sobre el cultivo durante todo el ciclo productivo, desde los primeros 10 días después de la siembra. Las primeras lluvias provocaron la germinación de semilla que quedó en el terreno del ciclo anterior, lo que permite una buena disponibilidad del tejido hospedante; por otro lado, Hernández-Morales *et al.* (2018) menciona que *Corynespora cassiicola* tiene otros hospedantes alternos como malezas y plantas cultivadas del área de producción, lo cual puede explicar los niveles de inóculo desde el inicio del cultivo. No obstante, las mayores poblaciones de esporas se presentaron durante el desarrollo de las yemas florales a cosecha, en los meses de octubre y noviembre. El inicio de emergencia de las flores se presenta a finales de septiembre, y coincide con días cortos de menos de 12 horas de exposición a la luz, lo cual ha sido bien documentado por Muslihatinn y Daesusi (2014). La concentración de esporas en el aire sobre el cultivo estuvo estrechamente relacionada

temporary distribution pattern of the pathogen's inoculant, in order to propose integrated disease management strategies.

Identification of fungi. In this investigation, the genus *Coniella* (= *Pilidiella*) was the most frequently found in the plantation and the most abundant in the air, whereas *Corynespora* was less frequent in the plantation and in the samples taken in the air. *Lasiodiplodia* was even less frequent and abundant on the crop. In turn, the *Curvularia* and *Alternaria* spores were abundant in the air, and *Curvularia* has been associated with RCS (Trujillo-Tapia and Ramírez-Fuentes, 2015). However, the study was centered on the genera *Coniella* and *Corynespora*, since they have been reported as pathogenic agents in roselle with the species *P.* (= *Coniella*) *diplodiella* as the cause of aqueous spots on leaves and defoliation of plants (Correa *et al.*, 2011), *C. javanica* as the cause of leaf and calyx blight and overall wilting of the plant (Barrón-Coronado *et al.*, 2019), and *Corynespora cassiicola*, reported as the causal agent of circular to irregularly-shaped, sunken necrotic spots on the calyx, and on leaves, circular to irregularly-shaped spots with light brown centers, black edges and purple rings that form necrotic areas when they join (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). The pathogenicity tests performed with *C. diplodiella* and *C. cassiicola* confirmed a very similar symptomatology between both fungi.

Weather and pathogens. The *Coniella* and *Corynespora* spores were caught over the plantation during the entire production cycle, starting on day 10 after planting. The first rainfalls caused the germination of seeds left on the soil during the previous cycle, which allows for a good availability of host tissue. On the other hand, Hernández-Morales *et al.* (2018) mention that *Corynespora cassiicola* has other, alternate hosts such as weeds

con la precipitación, temperatura, velocidad del viento y radiación global ambientales previas a su captura. Sin embargo, se encontraron correlaciones negativas entre la lluvia y la concentración de esporas de *Corynespora*, al parecer cuando ocurrieron lluvias torrenciales ≥ 138 mm en el mes de septiembre 2017, la densidad de esporas en el aire se redujo. Este comportamiento se ha reportado para otros hongos, como *Botrytis cinerea*, quienes indican que las gotas de lluvia reducen las esporas en el aire (Blanco *et al.*, 2006). Una situación similar reporta Pakpour *et al.* (2015) en un estudio urbano, donde indican que las concentraciones de esporas en el aire eran mayores cuando llovía poco y con altas temperaturas; las esporas de hongos persisten en el aire durante los períodos secos y la lluvia pueden disminuir la cantidad de esporas presentes en el aire. En contraste Ganthaler y Mayr (2015) indican que las condiciones húmedas del suelo y las hojas que persisten después de un evento de lluvia contribuyen a un aumento en la densidad de esporas de hongos en el aire.

La temperatura máxima y temperatura media diaria correlacionaron positivamente con la concentración de esporas de *Coniella*, en este estudio, el período con mayores capturas de esporas correspondió con períodos de temperatura entre 30-33.6 °C. Lo cual no corresponde a lo reportado para otros hongos como *Botrytis cinerea* por Sosa-Alvarez *et al.* (1995), quienes informaron que se produce una gran cantidad de esporas a una temperatura cercana a los 15-22 °C después de 7 días de humedad continua. No obstante, la producción y dispersión de las esporas son dos eventos diferentes y es probable que estas temperaturas máximas facilitaron la dispersión en el aire y por ello la mayor captura, puesto que las temperaturas mínimas diurnas de estos mismos días fueron de 19.4-20.4 °C (Cuadro 3 y Figura 1). Esta situación es posible que pueda ser explicada por los resultados encontrados con

and plants sown in the production area, which may explain the levels of inoculants from the beginning of planting. However, the largest spore populations appeared during the development of flower buds and until harvesting in October and November. Flowers began emerging in late September and coincided with days with less than 12 hours of sunlight, which has been documented by Muslihatinn and Daesusi (2014). The concentration of spores in the air over the crop was widely related to the rainfall, temperature, wind speed and global radiation in the environment before their capture. However. Negative correlations were found between the rains and the concentration of *Corynespora* spores, seemingly during heavy rainfalls ≥ 138 mm in September 2017, when the density of spores in the air diminished. This behavior has been reported for other fungi, such as *Botrytis cinerea*, indicating that raindrops reduce the number of spores in the air (Blanco *et al.*, 2006). A similar situation was reported by Pakpour *et al.* (2015) in an urban study that indicated that the concentrations of spores in the air were higher when rainfall was less and temperatures were higher; fungal spores persist in the air during the dry seasons and rain can reduce the number of spores present in the air. In contrast, Ganthaler and Mayr (2015) indicate that the humid soil conditions and the leaves that remain after a rainfall contribute to an increase in the density of fungal spores in the air.

The maximum and average daily temperature presented a positive correlation with the concentration of *Coniella* spores. In this study, the period with the highest number of spores corresponded with periods of temperatures between 30-33.6°C, which does not coincide with reports for other fungi such as *Botrytis cinerea* by Sosa-Alvarez *et al.* (1995), who stated that a large number of spores are produced at a temperature near 15-22 °C after 7 days of continuous humidity.

Botrytis cinerea donde se distinguen dos fases: la primera, hay una liberación de esporas del conidióforo mediada por un mecanismo higroscópico que controla la turgencia del conidióforo y, en segundo lugar, se presenta un episodio de transporte conidial mediado por agentes físicos (viento y las gotas de lluvia), situación que a menudo ocurre temprano en la mañana cuando la humedad relativa cambia y a medida que aumenta la temperatura (Blanco *et al.*, 2006). Al contrario, las poblaciones de *Corynespora* en este estudio mostraron una correlación significativamente negativa con la temperatura mínima, las mayores poblaciones se presentaron a temperaturas entre 17.2 a 20.7°C, lo cual difiere a lo reportado por Kamei *et al.* (2018), quienes indican que *C. cassiicola* provoca el progreso del manchado foliar en tomate a una temperatura óptima entre 24 y 25°C, junto con el 80-85% de humedad relativa. En cambio, Sharma (2017) reportan un rango más amplio de temperaturas de 16-32 °C, donde el alargamiento de la duración de la humedad de la hoja aumenta el número de lesiones de mancha foliar en algodón causado por *C. cassiicola* a todas las temperaturas probadas de 16, 20, 24, 28 y 32 °C, las mayores lesiones fueron a 28 °C con 48 horas de humedad de la hoja. Los patrones de distribución de esporas dentro del dosel de jamaica rara vez se han estudiado, se necesitan más datos y estudios para comprender completamente la epidemiología del complejo de enfermedades de la jamaica.

La presencia de vientos con velocidades máximas ≥ 4.4 km hr⁻¹ y el tiempo con luz solar diario ≤ 12 hrs estuvieron correlacionados negativamente con las bajas densidad de poblaciones de esporas de *Corynespora* en el aire. Mientras que la radiación global solar promedio diaria fue de ≥ 249 (W/m²) lo que favoreció el incremento de inóculo de *Coniella* en el aire y el total de esporas. El efecto de la luz solar sobre la esporulación de los hongos ha sido documentado y estudiado experimentalmente para

Despite this, the production and dispersal of spores are two different events, and it is possible that these maximum temperatures contributed to dispersion in the air, thus the greater capture, given that the minimum temperatures in the daytime of the aforementioned days were 19.4-20.4 °C (Table 3 and Figure 1). This situation may be explained by the results found with *Botrytis cinerea*, in which two phases were discerned: in the first, spores are released by the conidiophore with an intervention of a hygroscopic mechanism that controls the turgidity of the conidiophore, and secondly, there is an episode of conidial transport with the intervention of physical agents (wind and raindrops), which commonly takes place in the early hours of the morning, when the relative humidity changes and as temperatures rise (Blanco *et al.*, 2006). On the other hand, the *Corynespora* populations in this study displayed a significantly negative correlation with the minimum temperature. The largest populations appeared in temperatures between 17.2 and 20.7 °C, which differs from reports by Kamei *et al.* (2018), who indicate that *C. cassiicola* causes foliar spots to progress in tomato at an optimum temperature of 24 to 25 °C, along with a relative humidity of 80-85%. In turn, Sharma (2017) report a wider range of temperatures of 16-32 °C; longer-lasting humidity increases the number of lesions caused by foliar spots in cotton plants caused by *C. cassiicola* in all temperatures tested, of 16, 20, 24, 28 and 32 °C, and the largest lesions were displayed at 28 °C with leaf exposed to humidity for 48 hours. The spore distribution patterns in roselle canopies have rarely been studied. Further data and studies are required to fully understand the epidemiology of the roselle disease complex.

The presence of winds with maximum speeds of ≥ 4.4 km hr⁻¹ and the time with sunlight every day ≤ 12 hrs were negatively correlated with the low *Corynespora* spore population densities in the air. At

algunos hongos, el principal efecto fotomorfogénico es a través de la inducción de la esporulación (Ensminger 1993). Sin embargo, las longitudes de onda que inducen la esporulación a cantidades bajas pueden inhibir la esporulación en cantidades más altas (Paul 2000) y estas mismas longitudes de onda tienen efectos estimulantes o inhibidores sobre el desarrollo del conidio y afectan la fotomorfogénesis fúngica (Maddison y Manners 1973).

La variación anual del clima, principalmente en la temperatura y en menor grado las precipitaciones pueden determinar las concentraciones de esporas en el aire. Al parecer en el año con menos precipitación resultó con mayores concentraciones de esporas lo que puede tener implicaciones para el control de la enfermedad y de cambio climático.

Correlación entre severidad de MCJ y esporas de *Coniella* y *Corynespora*. Los resultados del presente trabajo mostraron que la interacción entre el hospedante, clima e inóculo, que prevalecieron durante las etapas fenológicas del cultivo de la jamaica, favoreció el desarrollo de la enfermedad.

En el presente estudio hubo correlaciones significativas positivas entre la severidad de MCJ y la concentración de esporas de *Coniella* y *Corynespora* y el total de esporas. Los niveles de inóculo de *Coniella* tuvo una mayor relación con la severidad en hojas y por el contrario *Corynespora* sus incrementos de inóculo sobre el cultivo se relacionó con la severidad de la enfermedad en el desarrollo de flores. Ambos géneros de hongos han sido reportados como agentes causales de enfermedades en jamaica: Correa *et al.* (2011) reportó a *Pilidiella* (= *Coniella*) *diplodiella* con síntomas del manchado acuoso de hojas, Barrón-Coronado *et al.* (2019) a *Coniella javanica* patógeno del tizón de hojas y cálices, Ortega-Acosta *et al.* (2015) reportaron a *Corynespora cassiicola* como patógeno del manchado de hojas y cálices.

the same time, average daily global solar radiation was ≥ 249 (W/m²), which favored the increase of *Coniella* inoculant in the air and the total of spores. The effect of sunlight on fungal sporulation has been documented and studied experimentally for some fungi; the main photomorphogenetic effect is through the induction of sporulation (Ensminger 1993). However, the wavelengths that induce sporulation in low amounts may inhibit sporulation in higher amounts (Paul 2000) and these same wavelengths have stimulating or inhibiting effects on the development of the conidia and affect fungal photomorphogenesis (Maddison and Manners 1973).

The annual weather variation, mainly regarding temperature and, to a lower extent, rainfall, may determine the concentrations of spores in the air. The year with the lowest rainfall levels seems to have resulted in higher spore concentrations, which may have implications on the control of the disease and of climate change.

Correlation between the severity of RCS and *Coniella* and *Corynespora* spores. The results of the present investigation showed that the interaction between the host, climate and inoculant that prevailed during the phenological stages of the roselle crop favored the development of the disease.

In the present study, there were positive significant correlations between the severity of RCS and the concentration of *Coniella* and *Corynespora* spores and the total spores. The levels of *Coniella* inoculant had a higher relation with the severity in leaves, and on the other hand, the increase of *Corynespora* inoculant on the crop was related with the severity of the disease in the development of flowers. Both fungus genera have been reported as causal agents in roselle diseases: Correa *et al.* (2011) reported *Pilidiella* (= *Coniella*) *diplodiella* with symptoms of aqueous spotting of leaves;

Durante la etapa de crecimiento vegetativo, desde la germinación de la semilla a inicio de yemas florales, la presencia de poblaciones de esporas de *Coniella*, y de una continua presencia de tejido susceptible (hojas jóvenes y maduras), de julio a principios de septiembre, no es limitante en cuanto a disponibilidad de tejido hospedante. No obstante, en septiembre, previo al inicio de la emergencia floral se observó una defoliación importante de hojas afectadas por manchas foliares, aunado a la poca concentración de inóculo en el aire, debido a la disminución de esporas presentes en el aire por las lluvias torrenciales en este mes, el SMN (2019) reporta una precipitación normal en septiembre de ≥ 434.8 mm. Cuando se presenta la floración de la jamaica (octubre y noviembre), coincide con la fase de crecimiento acelerado de la enfermedad presente en el follaje joven, con niveles altos de inóculo (*Coniella* y *Corynespora* con ≥ 100 y 8 esporas/semana respectivamente sobre el cultivo) y con las condiciones atmosféricas idóneas para la epidemia (temperatura media por día 25.3-26.6 °C, radiación promedio de 235.9-317.1, con humedades relativas $\geq 84\%$ y con 12-11.2 hrs de radiación solar por día).

Estos resultados pueden tener implicaciones para el control de la enfermedad, donde se han reportado hasta siete aplicaciones de fungicidas (mancozeb, clorotalonil y benomilo alternando con oxiclóruo de cobre), programados en prefloración, floración y fructificación, las cuales detiene las infecciones por *Corynespora cassiicola*, y por consiguiente una menor severidad de la enfermedad y mayor peso fresco y seco de cálices (Ortega-Acosta *et al.*, 2019). Sin embargo, es importante intentar reducir las aplicaciones de fungicidas inoportunas y potencialmente innecesarias, a través de información de muestreo de inóculo transportado por el aire, en tiempo cercano al real, que permita estimar el riesgo de acumulación potencial de esporas y su germinación, lo que ayudaría a ajustar los intervalos de aplicación de fungicidas.

Barrón-Coronado *et al.* (2019) reported *Coniella javanica*, pathogen of leaf and calyx blight; Ortega-Acosta *et al.* (2015) reported *Corynespora cassiicola* as a pathogen of leaf and calyx spotting.

During the stage of vegetative growth, from seed germination to early flower budding, the presence of *Coniella* spore populations, and a continuous presence of susceptible tissues (young and mature leaves) from July to September are not a limitation in terms of availability of host tissue. However, in September, before flower emergence, an important defoliation was observed of leaves affected by foliar spots, along with a low concentration of inoculants in the air, due to the reduction of spores in the air due to heavy rainfalls in said month, although the SMN (2019) reports a normal rainfall in September of ≥ 434.8 mm. When the roselle plant flowers (October and November), it coincides with the accelerated growth phase of the disease in the young foliage with high inoculant levels (*Coniella* and *Corynespora* with ≥ 100 and 8 spores/week respectively over the crop) and with ideal weather conditions for the epidemic (average daily temperature 25.3-26.6 °C, average radiation of 235.9-317.1, with a relative humidity $\geq 84\%$ and with 12-11.2 hrs of sunlight per day).

These results may have implications for the control of the disease, where up to seven applications of fungicides (mancozeb, chlorothalonil and benomyl alternating with copper oxychloride) have been reported, all programmed in pre-flowering, flowering and fruition, which curtail infections by *Corynespora cassiicola*, and therefore a lower severity of the disease and a higher fresh and dry weights of the calyces (Ortega-Acosta *et al.*, 2019). However, it is important to make an effort to reduce the applications of untimely and potentially unnecessary fungicides, with information on the sampling of airborne inoculants, as near as possible to real time, which helps estimate the potential risk of accumulation of spores and their germination,

CONCLUSIONES

Las esporas de *Coniella* y *Corynespora* fueron los géneros comunes presentes en el aire sobre el cultivo de jamaica. Las variaciones del clima, temperatura y precipitación principalmente, determinan las concentraciones de esporas sobre el cultivo. La severidad del manchado del cáliz estuvo correlacionada positiva y significativamente con el número de esporas de *Coniella* y *Corynespora* acumulados semanalmente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero y la Coordinación para el proyecto 13462934089 del Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Iguala.

LITERATURA CITADA

- Alejo JA. 2017. Jamaica (monocultivo). Pp: 23-29. In: Moczuma LG, González HA, Romero SME, Pérez MR, Castillo MCR. (Eds.). Agenda Técnica Agrícola de Guerrero. INIFAP. 116 p. www.inifap.gob.mx/SitePages/inifap2015/Inicio/Agendas_Tec.aspx
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389 – 3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Presss, The American Phytopathological Society, St Paul, Minn, USA. 218 pp.
- Barrón-Coronado AK, Ayala-Escobar V, Leyva-Mir SG, Nava-Díaz C, Aranda-Ocampo S and Hernández-Morales J. 2019. First report of *Coniella javanica* causing blight on roselle leaves and calyx in Guerrero, Mexico. *Plant disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-18-1609-pdn>
- Blanco C, De los Santos B and Romero F. 2006. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. *European Journal of Plant Pathology* 114:415–425. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-0007-3>
- Cesavegro (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guerrero). 2018. Manejo fitosanitario de la jamaica. <https://cesavegro.org.mx/manejo-fitosanitario-de-la-jamaica/>. (Consulta, diciembre de 2018).

which would help adjust the intervals of application of fungicides.

CONCLUSIONS

Coniella and *Corynespora* spores were the common genera present in the air over the roselle plantation. The weather variations, mainly temperature and rainfall, determine the concentrations of spores over the plantation. The severity of the calyx spotting was positively and significantly correlated with the number of *Coniella* and *Corynespora* spores accumulated every week.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the financial support and the coordination for project 13462934089 of the National Forestry, Agricultural and Livestock Research Institute (INIFAP), Iguala Experimental Field.

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

- Correa SE, Ortiz GCF, Torres CM, Bautista MCC, Rivera CMC, Lagunes ELC y Hernández SJH. 2011. Etiología de la mancha acuosa de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29(2): 165-167. <https://scholar.google.com/scholar?oi=gsb95&q=correa%202011%20jamaica&lookup=0&hl=es>
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA mini preparation: version II, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21. <https://doi.org/10.1007/bf02712670>
- Ensminger PA. 1993. Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. *Physiology Plant*. 88: 501-508. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01365.x>
- Gadoury DM and MacHardy WE. 1983. A 7-day recording volumetric spore trap. *Phytopathology* 73:1526-1531. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/-backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n11\\_1526.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/-backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n11_1526.PDF)
- Ganthaler A, Mayr S. 2015. Temporal variation in airborne spore concentration of *Chrysomyxa rhododendri*: correlation with weather conditions and consequences for Norway spruce infection. *Forest Pathology*. 45 (6): 443–449. <https://doi.org/10.1111/efp.12190>

- García E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación de Köppen. Serie Libros No. 6. Quinta Edición: corregida y aumentada. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., México. 98 p. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.1998.01.004>
- Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL, Ortega-Acosta SA, Vega-Muñoz R. 2018. Survey on alternative hosts of *Corynespora cassiicola*, the cause of the leaf and calyx spot, in the surroundings of roselle fields in Mexico. *Tropical Plant Pathology* 43 (3): 263-270. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0206-9>
- Kamei A, Dutta S, Sarker K, Das S, Datta G. and Goldar S. 2018. Target leaf spot of tomato incited by *Corynespora cassiicola*, an emerging disease in tomato production under Gangetic alluvial region of West Bengal, India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51:19-20, 1039-1048. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1545281>
- Maddison AC and Manners JG. 1973. Lethal effects of artificial ultraviolet radiation on cereal rust uredospores. *Transactions of the British Mycological Society* 60: 471-494. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(73\)80032-4](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(73)80032-4)
- Martínez SC. 2010. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado del cáliz de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. 88 p. <https://mx.123dok.com/document/wq2mxpry-etilogia-e-incidencia-de-hongos-asociados-al-manchado-de-calices-de-jamaica-hibiscus-sabdariffa-l-en-guerrero-mexico.html>
- Muslihatinn W and Daesusi R. 2014. Influence of photoperiod on the relative growth rate of *Hibiscus sabdariffa* L. *The Journal for Technology and Science*. 25(1): 18-22 <https://pdfs.semanticscholar.org/8fad/7d2dd729b1363209b2c72d2c749ebf170f0a.pdf>
- Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Ayala-Escobar V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant disease* 99(7):1041. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>
- Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Leyva-Mir SG, Velasco-Cruz C, Mora-Aguilera JA, Hernández-Morales J. 2019. Control químico del manchado de hojas y cálices de jamaica en Guerrero, México. *Summa Phytopathologica*, 45 (1): 38-43. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/182006>
- Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Hernández Ruiz J. 2016. Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle. *Mexican Journal of Phytopathology* 34: 270-285. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-6>
- Pakpour S, De-Wei LI, Klironomos J. 2015. Relationships of fungal spore concentrations in the air and meteorological factors. *Fungal Ecology* 13: 130-134. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.09.008>
- Paul ND. 2000. Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. *Environmental Pollution* 108: 343-355. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00213-4](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00213-4)
- Ruiz-Ramírez R, Hernández-Morales J, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L, Leyva-Mir, SG y Hernández-Ruiz J. 2015. Hongos asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 12-30. [www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100012](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100012)
- SAS Institute, Inc. 2010. SAS user's guide: Statistics. Release 9.3. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, C, SA. 1028 pp.
- Sharma, N. 2017. Epidemiology of target spot of cotton and tomato. M.S. Thesis, Auburn University. 107 p. <https://etd.auburn.edu/handle/10415/6011>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la SAGARPA). 2018. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2017 en México. El cultivo de jamaica. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. <http://www.siap.gob.mx/>. (Consulta, julio 2019).
- SMN (Servicio Meteorológica Nacional). 2019. Información meteorológica por estado. <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=gro>. (Consulta, julio 2019).
- Sosa-Álvarez M, Madden LV and Ellis MA. 1995. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease*. 79: 609-614. <https://doi.org/10.1094/pd-79-0609>
- Trujillo-Tapia MaN y Ramírez-Fuentes E. 2015. Fitopatógenos asociados al manchado del cáliz de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Iberoamericana de Ciencias* 2(4): 57-62.
- White T.J., T. Bruns S. Lee., and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J. Academic Press, Inc., New York. Pp. 315-322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang, Z., Schwartz S., Wagner L., and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7 (1/2):203-214.

# Identification of daylily rust (*Puccinia hemerocallidis*) and characterization of resistance of five genotypes

## Identificación de la roya del lirio de día (*Puccinia hemerocallidis*) y caracterización de la resistencia de cinco genotipos

Maricarmen Sandoval-Sánchez<sup>1\*</sup>, Cristian Nava-Díaz<sup>1</sup>, Jorge Pérez-Cárcomo<sup>2</sup>, José Sergio Sandoval-Islas<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Programa de Fitosanidad-Fitopatología, <sup>2</sup>Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. \*Autor para correspondencia: sandoval.maricarmen@colpos.mx

Recibido: 20 de Octubre, 2019.

Aceptado: 23 de Noviembre, 2019.

Sandoval-Sánchez M, Nava-Díaz C, Pérez-Cárcomo J and Sandoval-Islas JS. 2020. Identification of daylily rust (*Puccinia hemerocallidis*) and characterization of resistance of five genotypes. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 25-39.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1910-3

Primera publicación DOI: 02 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 02, 2019.

**Resumen.** El lirio de día (*Hemerocallis* spp.) es atacado por el hongo *Puccinia hemerocallidis*. En México no existen reportes de esta enfermedad o de material vegetal resistente al patógeno. Desde 2008, se han observado síntomas de roya sobre hojas de *H. lilioasphodelus* en el jardín de una casa particular en el municipio de Chicoloapan de Juárez, Estado de México y en un vivero de Fortín de las Flores, Veracruz. Los objetivos de esta investigación fueron identificar morfológica y molecularmente los aislamientos de ambas localidades y caracterizar la resistencia a esta enfermedad macroscópicamente en

**Abstract.** Daylily (*Hemerocallis* spp.) is attacked by the fungus *Puccinia hemerocallidis*. In Mexico there are no reports of this disease nor of plant material resistant to the pathogen. Since 2008, symptoms of rust on leaves of *H. lilioasphodelus* have been observed in the garden of a private house in the municipality of Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and in a nursery in Fortín de las Flores, Veracruz. The objectives of this investigation were to identify morphologically and molecularly the isolates of both locations and characterize the resistance to this disease macroscopically in five genotypes of *Hemerocallis* spp. under greenhouse conditions. According to the morphological characteristics of uredospores, teliospores and molecular studies, the fungus was identified as *P. hemerocallidis*. The genotypes evaluated were grouped into three resistance categories: *H. lilioasphodelus* behaved susceptible; ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars of the *H. hybrida* species were classified as moderately resistant; the cultivar ‘Cherry Wine’ and the species *H. fulva* were grouped as resistant;

cinco genotipos de *Hemerocallis* spp., bajo condiciones de invernadero. De acuerdo con las características morfológicas de uredosporas, teliosporas y estudios moleculares, el hongo se identificó como *P. hemerocallidis*. Los genotipos evaluados se agruparon en tres categorías de resistencia: *H. lilioasphodelus* se comportó susceptible; los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ de la especie *H. hybrida* se clasificaron como moderadamente resistentes; el cultivar ‘Cherry Wine’ y la especie *H. fulva* se agruparon como resistentes; esta última presenta una probable resistencia parcial *sensu* Parlevliet. La presencia de *P. hemerocallidis* y la resistencia de genotipos de lirio de día se reporta por primera vez en México.

**Palabras clave:** cultivares, *Hemerocallis lilioasphodelus*, *Hemerocallis fulva*, resistencia de hipersensibilidad, resistencia parcial.

El lirio de día (*Hemerocallis* spp.) es una de las plantas económicamente importante en EE. UU. y China por su uso ornamental y alimenticio, respectivamente. Es perenne y muy popular, debido a su periodo largo de floración, disponible en varios colores, formas y tamaños; capaz de sobrevivir con muy poco cuidado en climas diferentes, y presenta resistencia a la sequía, plagas y enfermedades (Munson, 1989; Grosvenor, 1999). En México, se considera una especie ornamental menor, pero en los últimos años ha adquirido una mayor importancia en jardinería de casas, hoteles, parques, carreteras, etc.

Para esta especie existen problemas fitopatológicos importantes que limitan su producción. En el año 2000 se reportó por primera vez en Norteamérica, en el estado de Georgia, EE. UU., una enfermedad devastadora en el cultivar ‘Pardon Me’, que por sus síntomas y signos, correspondió al grupo de

the latter presents a probable partial resistance *sensu* Parlevliet. The presence of *P. hemerocallidis* and the resistance of daylily genotypes are reported for the first time in Mexico.

**Keywords:** cultivars, *Hemerocallis lilioasphodelus*, *Hemerocallis fulva*, hypersensitivity resistance, partial resistance.

Daylily (*Hemerocallis* spp.) is one of the economically important plants in the United States and China because of its ornamental and food use, respectively. It is a perennial and very popular plant because of its long flowering period, availability in several colors, forms and sizes, ability to survive with very little care in different climates, and resistance to drought, pests and diseases (Munson, 1989; Grosvenor, 1999). In Mexico, daylily is considered a minor ornamental species but in the last years has become more important in home, hotels, parks and highways gardening, among others.

However, there are important phytopathological issues that limit daylily production. In 2000, a devastating disease was reported for the first time in the state of Georgia, United States, in the ‘Pardon Me’ cultivar, which, according to the symptoms, corresponded to the group of rusts (Williams-Woodward *et al.*, 2001). The fungus was identified as *Puccinia hemerocallidis*, a pathogen originally from Asia that has caused damage in Asia, mainly in China, Japan, Korea, Russia, Taiwan and Thailand (Smith, 2009). In 2001, the fungus was detected in another 20 states of the United States (Hernández *et al.*, 2002), and later also in Brazil (Carvalho *et al.*, 2001), Colombia (Pardo-Cardona, 2006), South Africa (Mostert *et al.*, 2008), Venezuela (Pardo-Cardona *et al.*, 2008), Canada, Panama and Australia (Smith,

las royas (Williams-Woodward *et al.*, 2001). Este hongo fue identificado como *Puccinia hemerocallidis*, patógeno de origen asiático que ha causado daños en Asia, principalmente en China, Japón, Corea, Rusia, Taiwán y Tailandia (Smith, 2009). En el 2001 fue reportado en otros 20 estados de EE. UU. (Hernández *et al.*, 2002) y después se confirmó su presencia en Brasil (Carvalho *et al.*, 2001), Colombia (Pardo-Cardona, 2006), Sudáfrica (Mostert *et al.*, 2008), Venezuela (Pardo-Cardona *et al.*, 2008), Canadá, Panamá y Australia (Smith, 2009) y Portugal (Silva *et al.*, 2016). En México, no existen reportes sobre su presencia pero se ha observado plantas sintomáticas desde 2008 en Aguascalientes, Estado de México, Morelos, Veracruz y Zacatecas. Actualmente, se desconoce cuál es el agente causal de la roya del lirio de día en México y qué material vegetal es resistente al patógeno. Los objetivos de esta investigación fueron: identificar el agente causal de la roya del lirio de día en el Estado de México y Veracruz, con base en características morfológicas y moleculares, y evaluar la resistencia de cinco genotipos de *Hemerocallis* spp. al agente causal de la roya bajo condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Plantas adultas infectadas con roya y plantas con apariencia sana de *Hemerocallis lilioasphodelus* se recolectaron en un jardín particular del municipio de Chicoloapan de Juárez, Estado de México y en un vivero ubicado en el municipio Fortín de las Flores, Veracruz. Los cultivares ‘Radiant Greetings’, ‘Stella d’Oro’ y ‘Cherry Wine’ de la especie *H. hybrida*, así como la especie *H. fulva* se consiguieron en un jardín de la Ciudad de México, todos con apariencia sana.

Cada planta se sembró en una maceta con suelo pasteurizado. En una mesa se colocaron las plantas libres de roya y en otra las infectadas. Las plantas

(2009) and Portugal (Silva *et al.*, 2016). Although there are no reports on the pathogen in Mexico, plants showing symptoms have been observed since 2008 in Aguascalientes, the State of Mexico, Morelos, Veracruz and Zacatecas. The causal agent of daylily rust and what plant material is resistant to the pathogen are currently unknown in Mexico. Therefore, the objectives of this research were to identify the causal agent of daylily rust in the State of Mexico and Veracruz, based on morphological and molecular characteristics, and evaluate the resistance of five *Hemerocallis* spp. genotypes to the causal agent of rust under greenhouse conditions.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** *Hemerocallis lilioasphodelus* adult plants infected with rust and plants with healthy appearance were collected in a private garden in the municipality of Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and in a greenhouse in the municipality of Fortín de las Flores, Veracruz. ‘Radiant Greetings,’ ‘Stella d’Oro’ and ‘Cherry Wine’ cultivars from the *H. hybrida* and *H. fulva* species were obtained from a garden in Mexico City, all of them with healthy appearance.

Each plant was sown in a pot containing pasteurized soil. The rust-free plants were placed on a table, and the infected plants on another table. The plants with healthy appearance were pruned to obtain new tissue, inoculate them and increase inoculum; then a resistance evaluation was performed. Irrigation was applied to each pot every other day using 200 mL of water. Each pot was fertilized with 2 g of Nitrofoska® Azul (12-12-17+Mg+S+ micronutrients) every 15 days.

**Obtaining inoculum.** The initial inoculum was 100 mg of *P. hemerocallidis* uredospores.

con apariencia sana se podaron para obtener tejido nuevo, inocularlas e incrementar el inóculo; posteriormente, se realizó la evaluación de la resistencia. El riego se hizo cada tercer día aplicando 200 mL de agua por maceta. Cada maceta se fertilizó con 2 g de Nitrofoska® Azul (12-12-17+Mg+S+ micro-nutrientes) cada 15 días.

**Obtención de inóculo.** El inóculo inicial fue 100 mg de uredosporas de *P. hemerocallidis*. Las esporas se recolectaron sacudiendo las hojas con esporulación sobre una lámina de papel aluminio de 20 x 20 cm. Los aislamientos se nombraron de acuerdo con el lugar de la recolección: RCH1, del municipio de Chicoloapan de Juárez, Estado de México; y RFOR2, del municipio de Fortín de las Flores, Veracruz.

**Incremento de inóculo.** Para evaluar la resistencia se incrementó el inóculo inicial de RCH1 y RFOR2. Se prepararon suspensiones de uredosporas de cada aislamiento a una concentración de  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  en aceite mineral Soltrol 170® y las suspensiones se asperjaron uniforme y separadamente sobre plantas del mismo genotipo de las cuales se obtuvieron las esporas. La aspersión se realizó con un atomizador a presión constante inyectada mediante una bomba de vacío en el invernadero de royas del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Una vez asperjadas las plantas, se dejó evaporar el aceite y se colocaron durante 18 h en una cámara de incubación bajo oscuridad completa a 14 °C y 100% de humedad relativa, para lo cual se utilizó un nebulizador Micro-Jet ULV® modelo 7401, por 20 min. Después se trasladaron a un invernadero con temperatura media de 24 °C. Una vez que el hongo esporuló, se recolectaron las esporas y se conservaron en frascos sellados herméticamente a 5 °C.

Spores were collected by shaking the leaves with sporulation on a 20 x 20 cm foil sheet. The isolates were named according to the site where they were collected: RCH1, from the municipality of Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and RFOR2, from the municipality of Fortín de las Flores, Veracruz.

**Inoculum increase.** To evaluate the resistance, the initial inoculum of RCH1 and RFOR2 was increased. Uredospore suspensions of each isolate were prepared at a concentration of  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  in Soltrol 170® mineral oil, and then uniformly and separately sprayed on plants of the same genotype from which the spores were obtained. The plants were sprayed using a constant-pressure sprinkler injected through a vacuum pump in the rust greenhouse of the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT, for its acronym in Spanish). After spraying the plants with the suspension, the oil was left to evaporate and the plants were placed in an incubation chamber for 18 h under complete darkness at 14 °C and 100% relative humidity, for which a Micro-Jet ULV® model 7401 was used for 20 min. Then the plants were taken to a greenhouse with average temperature of 24 °C. When the fungus sporulated, spores were collected, placed in hermetically sealed jars and kept at 5 °C.

**Morphological identification.** The isolates were morphologically identified based on the form and size of the uredospores and teliospores obtained from cuts of uredia and telia from the collected material. The Cummins and Hiratsuka (1996) key for genera and sections was used in the case of genus, and the descriptions of Hiratsuka *et al.* (1992) and Hernández *et al.* (2002) for species.



**Identificación morfológica.** Los aislamientos se identificaron morfológicamente con base en la forma y dimensiones de uredosporas y teliosporas, obtenidas de cortes de uredias y telias del material recolectado. Se usó la clave de géneros y secciones de Cummins y Hiratsuka (1996) para el género, y las descripciones de Hiratsuka *et al.* (1992) y Hernández *et al.* (2002) para la especie.

**Identificación molecular.** El ADN de los dos aislamientos se extrajo con la metodología descrita por Ahrens y Seemüller (1992). La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (Ultrapure, Gibco, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). La concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro Lambda BIO 10 (Perkin-Elmer®), diluciones con 20 ng se usaron para la amplificación de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2, y el gen 5.8S ribosomal, mediante PCR y la combinación de los iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG). El producto amplificado se purificó con el kit Wizard (Promega®, USA) y se secuenció con el ABI PRISM 3700 (Applied Biosystem®, USA). Las secuencias consenso se ensamblaron y editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999) y se depositaron en el GenBank (NCBI, 2012).

### Caracterización de la resistencia

**Inoculación.** Se condujeron dos experimentos; el primero en marzo del 2018 y el segundo en mayo del mismo año. Las hojas viejas de todos los genotipos se cortaron tres días antes de la inoculación para inocular sólo las hojas jóvenes, asperjándolas con una suspensión de uredosporas frescas de

**Molecular identification.** The isolates DNA was extracted using the methodology described by Ahrens and Seemüller (1992). The DNA quality was verified through horizontal electrophoresis in 1% agarose gel (Ultrapure, Gibco, USA) and the bands were visualized using a transilluminator (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). The DNA concentration was quantified using a Lambda BIO 10 (Perkin-Elmer®) spectrophotometer, and dilutions with 20 ng were used to amplify the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2), and the 5.8S ribosomal gene using PCR and by combining ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) and ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) universal primers. The amplified product was purified using the Wizard kit (Promega® USA) and sequenced with ABI PRISM 3700 (Applied Biosystem®, USA). The consensus sequences were assembled and edited using the CAP option (Contig Assembly Program) of BioEdit v7.0.9.1 software (Hall, 1999) and deposited in the GenBank (NCBI, 2012).

### Characterization of resistance

**Inoculation.** Two experiments were conducted: the first in March 2018, and the second in May 2018. The old leaves of all the genotypes were cut three days before inoculation in order to inoculate only young leaves by spraying them with a suspension of RCH1 and RFOR2 fresh uredospores at a concentration of  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>. The uredospores were suspended in 96% ethanol (1 g L<sup>-1</sup>). The plants were placed in an incubation chamber under the same conditions described for inoculum increase, and in both experiments the plants were kept in a greenhouse at 24 °C average temperature. The experiment unit consisted of one pot with one plant, and five replications for each genotype and for each fungus isolate.

RCH1 y RFOR2 a una concentración de  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>. Las uredosporas se suspendieron en etanol al 96% (1 g L<sup>-1</sup>). Después, las plantas se colocaron en una cámara de incubación bajo las mismas condiciones descritas en el incremento de inóculo y en ambos experimentos, las plantas se mantuvieron en un invernadero con temperatura media de 24 °C. La unidad experimental consistió de una maceta con una planta y se utilizaron cinco repeticiones para cada genotipo y para cada aislamiento del hongo.

**Medición de la resistencia.** Las variables que se evaluaron fueron el periodo de latencia (PL) (días desde la inoculación hasta la esporulación) y el tipo de infección (TI), que se refiere a la reacción del tejido del hospedante ante la no invasión o invasión del patógeno. Las plantas se revisaron diariamente entre los tres y 21 días después de la inoculación (ddi) y para registrar el TI se usó la siguiente clasificación establecida por Mueller *et al.* (2003): R=resistente, ausencia de lesiones o muy pocas restringidas a una reacción de hipersensibilidad sin esporulación; MR=moderadamente resistente, muy pocas lesiones y producción de algunas uredosporas; MS=moderadamente susceptible, número de lesiones ligeramente reducido o esporulación retrasada; S=susceptible, número considerable de lesiones y de cantidad de esporulación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Descripción de signos y síntomas de la enfermedad.** Las plantas infectadas de *H. lilioasphodelus* colectadas en Chicoloapan, Estado de México, mostraron en el haz y envés de las hojas lesiones avanzadas intervenales de color amarillo, rectangulares y coalescentes sobre las cuales había uredias medianas subepidermales, densas, de forma

**Measurement of resistance.** The evaluated variables were the latency period (LP) (days from inoculation to sporulation) and infection type (IT), which refers to the reaction of the host tissue to the pathogen invasion and no-invasion. The plants were inspected daily between days three and 21 after inoculation (dai), and to record the IT, the following classification established by Mueller *et al.* (2003) was used: R=resistant, no lesions or very few lesions restricted to a hypersensitivity reaction without sporulation; MR=moderately resistant, very few lesions and production of some uredospores; MS=moderately susceptible, a slightly reduced number of lesions or delayed sporulation; S=susceptible, a considerable number of lesions and amount of sporulation.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Description of the disease signs and symptoms.** The leaves of plants infected with *H. lilioasphodelus* that were collected in Chicoloapan, State of Mexico, showed interveinal advanced lesions yellow in color, rectangular and coalescent on the upper surface and underside, on which the development of dense, oval, rectangular or irregular shaped medium-sized subepidermal uredia with abundant bright yellow uredospores, was observed (Figure 1-A and B). The leaves of plants collected in Fortín de las Flores, Veracruz, showed initial lesions on the underside that corresponded to medium-sized, dense and circular subepidermal uredia with bright yellow uredospores that matched the upper surface with yellowish, circular or quadrangular spots (Figure 1-C).

Telia were observed only on leaves of the plants collected in Fortín de las Flores, which were black in color, erumpent and slightly long and dense (Figure 1-D). The main symptom observed when

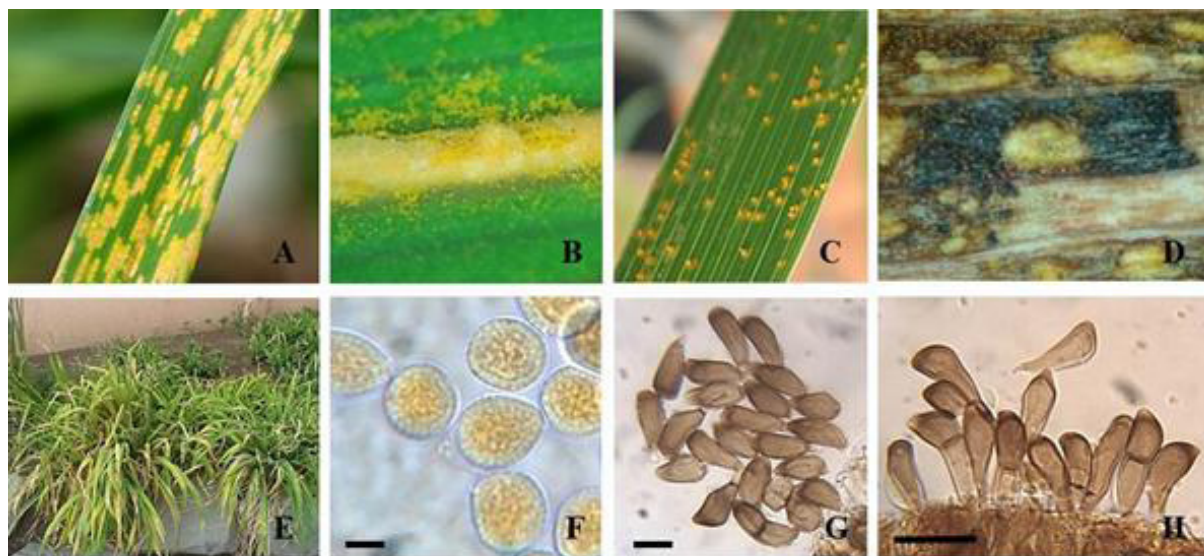
ovalada, rectangular o irregular y con abundantes uredosporas amarillo brillante (Figura 1-A y B). Las plantas colectadas en Fortín de las Flores, Veracruz, presentaron lesiones iniciales en el envés de las hojas, correspondientes a uredias medianas, subepidermales, densas y circulares, con uredosporas de color amarillo brillante que se correspondían en el haz con manchas amarillentas de forma circular o cuadrangular (Figura 1-C).

Sólo se observaron telias sobre el envés de hojas de las plantas colectadas en Fortín de las Flores, estas de color negro, ligeramente alargadas, errumpentes y poco densas (Figura 1-D). Se observó que cuando las pústulas de uredias y telias invadieron

uredia and telia pustules invaded the leaf area was a general yellowing of leaves that eventually became necrosed, a fact that caused photosynthesis to slow down, thus reducing the plant growth, as well as the size and number of flowers (Figure 1-E).

### Morphological identification of the fungus

**Identification at the genus level.** Bicellular, pedicelled and horizontally septated teliospores inside non-jelly telia were observed; no peridium in palisade was observed in uredia and telia. According to Cummins and Hiratsuka (1996), these characteristics correspond to the *Puccinia* genus.



**Figura 1.** Síntomas y signos de *Puccinia hemerocallidis* en plantas de *Hemerocallis lilioasphodelus* L. recolectadas en Chicoloapan de Juárez, Estado de México y Fortín de las Flores, Veracruz. A) Lesiones avanzadas intervenales amarillentas, rectangulares y coalescentes sobre el haz y B) Uredia errumpente con uredosporas amarillo brillante sobre el haz de plantas colectadas en Chicoloapan de Juárez. C) Lesiones iniciales con uredosporas sobre el envés y D) Telias negras, alargadas y poco densas sobre una hoja necrótica de plantas colectadas en Fortín de las Flores. E) Plantas severamente infestadas, mostrando amarillamiento. F) Uredosporas. G) Teliosporas no septadas. H) Teliosporas septadas. Barras: F=10 µm, G=20 µm, H=40 µm.

**Figure 1.** *Puccinia hemerocallidis* symptoms and signs in *Hemerocallis lilioasphodelus* L. plants collected in Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and Fortín de las Flores, Veracruz. A) Interveinal advanced lesions yellow in color, rectangular and coalescent on the upper surface; and B) Erumpent uredia with bright yellow uredospores on the upper surface of plants collected in Chicoloapan de Juárez. C) Initial lesions with uredospores on the underside; and D) Black, long and slightly dense telia on a necrotic leaf of plants collected in Fortín de las Flores. E) Plants severely infected that show yellowing. F) Uredospores. G) Non septated teliospores. H) Septated teliospores. Bars: F=10 µm, G=20 µm, H=40 µm.

la superficie de la hoja, el síntoma principal se manifestó como un amarillamiento general de la hoja que eventualmente se necrosó, lo que repercutió en la disminución de fotosíntesis y por tanto, se redujo el crecimiento de la planta, así como el tamaño y número de flores (Figura 1-E).

### Identificación morfológica del hongo

**Identificación a nivel de género.** Se observaron teliosporas bicelulares, pediceladas y horizontalmente septadas, dentro de telias no gelatinosas; las uredias y telias no se observaron con peridio en palisada. De acuerdo a Cummins y Hiratsuka (1996), estas características corresponden al género *Puccinia*.

**Identificación a nivel de especie.** Las uredosporas de ambos aislamientos se observaron de color amarillo, de forma globosa a elipsoide, con la pared hialina y equinulada, y algunas unidas a un pedicelo corto que emergía del fondo de la uredia. No se observaron poros germinales. Las medidas de las uredosporas del aislamiento RCH1 estuvieron dentro del rango: 18.3-22.3 x 15.13-19.3  $\mu\text{m}$  (media = 20.06  $\mu\text{m} \pm 1.64$  por 17.157  $\mu\text{m} \pm 1.41$ , n = 100). Las uredosporas del aislamiento RFOR2 midieron: 18-22.7 x 16.4-19.3  $\mu\text{m}$  (media = 20.17  $\mu\text{m} \pm 1.81$  por 17.749  $\mu\text{m} \pm 1.28$ , n = 100) (Figura 1-F).

Sólo se encontraron teliosporas del aislamiento RFOR2, de forma elipsoidal y clavadas, con papila en el ápice de forma redondeada o angular y excéntrica. En su mayoría se observaron teliosporas no septadas, que midieron 30.1-40.8 x 13.3-17.5  $\mu\text{m}$  (media = 35.887  $\mu\text{m} \pm 4.70$  por 15.518  $\mu\text{m} \pm 1.67$ , n = 100) (Figura 1-G). Las teliosporas septadas midieron 42.1-51.2 x 14.5-21.2  $\mu\text{m}$  (media = 46.526  $\mu\text{m} \pm 3.86$  por 17.544  $\mu\text{m} \pm 2.7$ , n = 100) (Figura 1-H). La pared de las teliosporas se observó lisa y café oscuro conforme se acercaba al ápice; a los lados

**Identification at the species level.** Uredospores of both isolates were yellow in color, globose to ellipsoid, with hyaline and equinulated walls, and some were attached to a short pedicel that emerged from the bottom of the uredia. No germinal pores were observed. Measurements of uredospores of the RCH1 isolate were within range: 18.3-22.3 x 15.13-19.3  $\mu\text{m}$  (mean = 20.06  $\mu\text{m} \pm 1.64$  by 17.157  $\mu\text{m} \pm 1.41$ , n = 100). Measurements of uredospores of the RFOR2 isolate were: 18-22.7 x 16.4-19.3  $\mu\text{m}$  (mean = 20.17  $\mu\text{m} \pm 1.81$  by 17.749  $\mu\text{m} \pm 1.28$ , n = 100) (Figure 1-F).

Teliospores were found only in the RFOR2 isolate, which were ellipsoid and nailed, and had a rounded, angular and eccentric papillae at the apex. Most of the teliospores observed had no septa and measured 30.1-40.8 x 13.3-17.5  $\mu\text{m}$  (mean = 35.887  $\mu\text{m} \pm 4.70$  by 15.518  $\mu\text{m} \pm 1.67$ , n = 100) (Figure 1-G). Septated teliospores measured 42.1-51.2 x 14.5-21.2  $\mu\text{m}$  (mean = 46.526  $\mu\text{m} \pm 3.86$  by 17.544  $\mu\text{m} \pm 2.7$ , n = 100) (Figure 1-H). The teliospores wall was smooth and turned dark brown as it approached the apex; its sides measured 1 to 1.8  $\mu\text{m}$  (mean = 1.365  $\mu\text{m}$ ) and 3.1-5.3  $\mu\text{m}$  at the apex (mean = 4.7  $\mu\text{m} \pm 0.77$ , n = 20).

The morphological characteristics of uredospores and teliospores coincided with the description of *P. hemerocallidis* provided by Hiratsuka *et al.* (1992), Williams-Woodward *et al.* (2001) and Hernández *et al.* (2002). Uredospores of both isolates were slightly smaller than those described by the authors and, the same as in the other American specimens, no septated teliospores were observed. No alternate host was observed in the identified rust, but according to Hiratsuka *et al.* (1992), *P. hemerocallidis* has Type 4 spermatogonia.

**Molecular identification.** After amplification using ITS5 and ITS4 primers, 618 and 623 bp fragments, approximately, were obtained and then deposited

midió de 1 a 1.8  $\mu\text{m}$  (media = 1.365  $\mu\text{m}$ ) y en el ápice 3.1-5.3  $\mu\text{m}$  (media = 4.7  $\mu\text{m} \pm 0.77$ ,  $n = 20$ ).

Las características morfológicas de uredosporas y teliosporas coincidieron con las descripciones de *P. hemerocallidis* realizadas por Hiratsuka *et al.* (1992), Williams-Woodward *et al.* (2001) y Hernández *et al.* (2002). Las uredosporas de ambos aislamientos resultaron ligeramente más pequeñas que aquellas descritas por los autores y al igual que en los otros especímenes americanos, se observaron teliosporas no septadas. No se contó con la presencia del hospedante alterno de la roya identificada, pero de acuerdo con Hiratsuka *et al.* (1992), *P. hemerocallidis* posee espermagonios tipo 4.

**Identificación molecular.** Con las ampliificaciones usando los primers ITS5 e ITS4, se obtuvieron fragmentos de 618 y 623 bp aproximadamente, los cuales se depositaron en el genbank (números de acceso FJ897533 y FJ897535). Los resultados del BLASTN confirmaron que los aislamientos RCH1 y RFOR2 correspondieron a *P. hemerocallidis*, ya que la región ITS reveló similitud de nucleótidos de 99% con *P. hemerocallidis* (número de acceso AF479742).

**Caracterización de la resistencia.** De acuerdo con el periodo de latencia y tipo de infección, los genotipos evaluados se agruparon en tres categorías de resistencia a *P. hemerocallidis* (Cuadro 1). No se observaron diferencias de los tipos de infección entre aislamientos y experimentos. El tipo de infección registrado por genotipo fue uniforme entre aislamientos.

La especie *H. lilioasphodelus* se comportó susceptible al presentar inicialmente pequeñas lesiones abundantes, cloróticas húmedas y brillantes a los tres días después de la esporulación (ddi), las cuales esporularon a los seis ddi en forma de uredias pequeñas y redondas de color amarillo brillante,

in the Genbank (access numbers FJ897533 and FJ897535). The results of BLASTN confirmed that the RCH1 and RFOR2 isolates corresponded to *P. hemerocallidis*, since the ITS region showed 99% nucleotide similarity with *P. hemerocallidis* (access number AF479742).

**Characterization of resistance.** Based on the latency period and type of infection, the evaluated genotypes were grouped in three categories of resistance to *P. hemerocallidis* (Table 1). No infection differences were observed between isolates and experiments. The type of infection recorded by genotypes was uniform among isolates. The *H. lilioasphodelus* species was susceptible because it initially showed abundant, humid chlorotic and bright small lesions three days after inoculation (dai), which sporulated six dai in the form of small and round bright yellow uredia that grew in extended form and had abundant sporulation on leaf upper surface and backside (10 dai) (Figure 2-A). ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars showed reddish small necrotic lesions five dai, which indicated a hypersensitivity reaction. However, at 10 and 11 dai, respectively, a yellow initial sporulation was observed on some lesions, so they were classified as moderately resistant (Figure 2-B and C). The *H. fulva* species showed a reduced number of small chlorotic, humid and bright lesions without sporulation at six dai, so it was classified as resistant (Figure 2-D), the same as ‘Cherry Wine’ cultivar, which had no lesions or sporulation (Figure 2-E).

The hypersensitivity reaction (HR) is an active resistance mechanism that operates after the parasite penetrates. In the broad sense, this mechanism is attributed to the presence of major resistance genes that limit the reaction of a specific parasite genotype, but they actually limit a range of interactions ranging from immunity up to a certain

**Cuadro 1. Período de latencia y tipo de infección de cinco genotipos de lirio de día (*Hemerocallis* spp.) inoculados con dos aislamientos de *P. hemerocallidis*. Datos registrados 21 días después de la inoculación.**

**Table 1. Latency period and type of infection of five daylily genotypes (*Hemerocallis* spp.) that were inoculated with two *P. hemerocallidis* isolates. Data recorded 21 days after inoculation.**

| Genotipo                  | Aislamiento RCH1 <sup>x</sup> |                                | Aislamiento RFOR2 <sup>y</sup> |                   |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
|                           | Período de latencia (días)    | Tipo de infección <sup>z</sup> | Período de latencia (días)     | Tipo de infección |
| <i>H. lilioasphodelus</i> | 6                             | S                              | 6                              | S                 |
| ‘Radiant Greetings’       | 10                            | MR                             | 10                             | MR                |
| ‘Stella d’Oro’            | 11                            | MR                             | 11                             | MR                |
| <i>H. fulva</i>           | -                             | R                              | -                              | R                 |
| ‘Cherry Wine’             | -                             | R                              | -                              | R                 |

<sup>x</sup>Chicoloapan, Estado de México / Chicoloapan, State of Mexico.

<sup>y</sup>Fortín de las Flores, Veracruz.

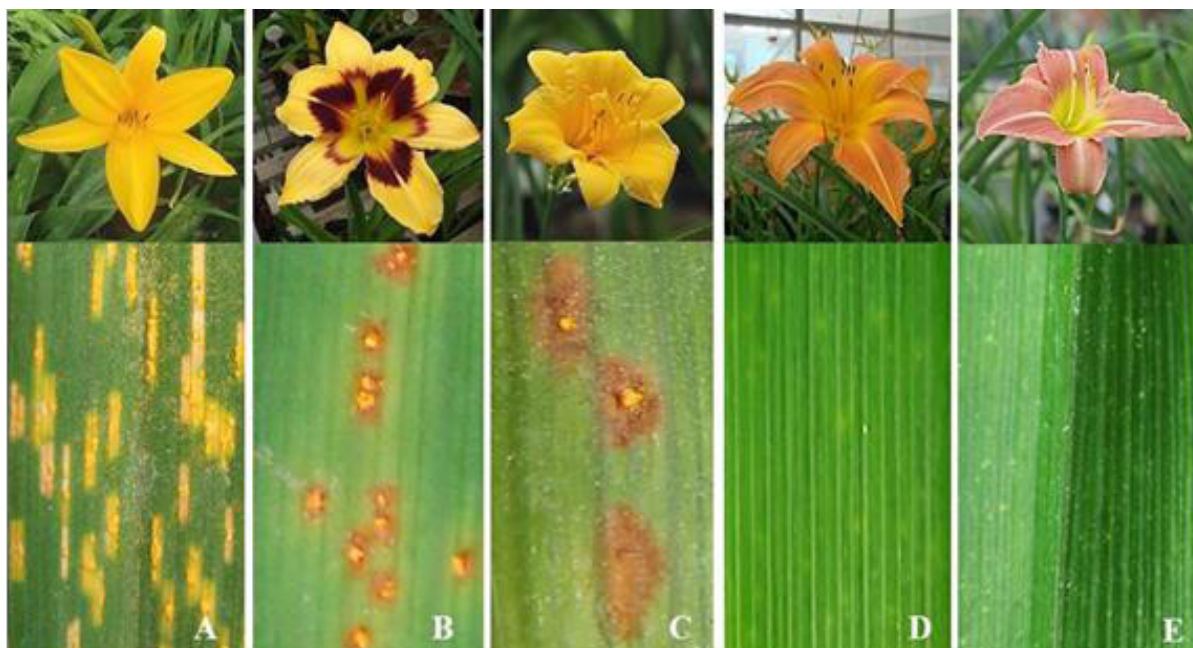
<sup>z</sup>R= resistente; MR= moderadamente resistente; S= susceptible / R= resistant; MR= moderately resistant; S= susceptible.

que crecieron de forma extendida y con abundante esporulación en el haz y envés (10 ddi) (Figura 2-A). Los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ presentaron pequeñas lesiones necróticas de color rojizo a los cinco ddi, indicando reacción de hipersensibilidad; sin embargo, a los 10 y 11 ddi, respectivamente, se observó una incipiente esporulación de color amarillo en algunas lesiones, por lo que se clasificaron como moderadamente resistentes (Figura 2-B y C). La especie *H. fulva* presentó un número reducido de pequeñas lesiones cloróticas, húmedas y brillantes sin esporulación a los seis ddi, por lo que se clasificó como resistente (Figura 2-D), al igual que el cultivar ‘Cherry Wine’, el cual no presentó lesiones ni esporulación (Figura 2-E).

La reacción de hipersensibilidad (RH) es un mecanismo de resistencia activa y opera después de la penetración del parásito. En sentido amplio, este mecanismo se atribuye a la presencia de genes mayores para resistencia que condicionan la reacción a un genotipo específico del parásito, pero en realidad, condicionan un rango de interacciones desde inmunidad hasta cierto grado de susceptibilidad (Jones y Clifford, 1983).

level of susceptibility (Jones and Clifford, 1983).

The genes that confer HR cause the host cell to collapse after the haustorium is formed. The cell collapses a few hours after penetration in order to interfere with the fungus nutriment supply, causing a rapid death of the infection hyphae. At first glance, this phenomenon can be observed in the form of yellowish and necrotic spots. In other cases, the collapse is slower and allows the formation of uredospores (Parlevliet and van Ommere, 1975; Niks *et al.*, 2011). This explains the type of infection observed in ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars, because in both cases, hypersensitivity lesions were first observed, but later uredia were detected in some lesions. The studies conducted by Mueller *et al.* (2003), Li *et al.* (2007) and Buck (2013) indicate that ‘Stella d’Oro’ cultivar was moderately resistant, resistant and highly resistant, respectively, where the type of infection was limited to necrotic lesions. The reactions observed in the experiments conducted in this study for the cultivar are similar to those reported by the authors, so it seems that there is no variation in the pathogen virulence.



**Figura 2.** Tipos de infección por *P. hemerocallidis* sobre cinco genotipos de *Hemerocallis* spp., a los 21 días después de la inoculación. A) Uredias y uredosporas sobre el genotipo susceptible *H. lilioasphodelus*, (10 ddi). B) Lesiones necróticas (reacción de hipersensibilidad) e incipiente esporulación sobre el cultivar moderadamente resistente ‘Radiant Greetings’, (10 ddi). C) Reacción de hipersensibilidad e incipiente esporulación sobre el cultivar moderadamente resistente ‘Stella d’Oro’, (11 ddi). D) Lesiones cloróticas diminutas sin esporulación sobre el genotipo resistente *H. fulva*, (6 ddi) E) Ausencia de lesiones sobre el cultivar resistente ‘Cherry Wine’.

**Figure 2.** Types of infection caused by *P. hemerocallidis* in five *Hemerocallis* spp. genotypes 21 days after inoculation. A) Uredia and uredospores on the *H. lilioasphodelus* susceptible genotype (10 dai). B) Necrotic lesions (hypersensitivity reaction) and initial sporulation in the moderately resistant ‘Radiant Greetings’ cultivar (10 dai). C) Hypersensitivity reaction and initial sporulation in the moderately resistant ‘Stella d’Oro’ cultivar (11 dai). D) Tiny chlorotic lesions without sporulation in the *H. fulva* resistant genotype (6 dai); E) No lesions on the ‘Cherry Wine’ resistant cultivar.

Los genes que confieren RH causan un colapso de la célula del hospedante después de que el haustorio se ha formado. La célula se colapsa a pocas horas de la penetración para interferir con el suministro del nutrimento del hongo, lo cual lleva a una muerte rápida de la hifa de infección. Este fenómeno se puede observar a simple vista como manchas amarillentas y puntos necróticos. En otros casos el colapso es más lento y puede permitir la formación de uredosporas (Parlevliet y van Ommere, 1975; Niks *et al.*, 2011). Esto explica el tipo de infección observado en los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’; en ambos se formaron

The *H. fulva* genotype showed slow sporulation on some of the chlorotic lesions outside of the interval of the resistance evaluation, approximately 28 days after inoculation. Parlevliet and van Ommere (1975) indicated that genotypes with partial resistance have a susceptible type of infection (complete compatibility between the pathogen and its host, which indicates the absence of hypersensitivity), and that the latency period is far longer, while the infection is less frequent compared to a susceptible host. From the established experiments, major differences can be observed in the latency period and infection

primero lesiones de hipersensibilidad, pero después se apreciaron uredias en algunas lesiones. Los estudios de Mueller *et al.* (2003), Li *et al.* (2007) y Buck (2013) señalan que el cultivar ‘Stella d’Oro’ se comportó moderadamente resistente, resistente o altamente resistente, respectivamente, en donde el tipo de infección se limitó a lesiones necróticas. Las reacciones observadas en los experimentos del presente estudio en dicho cultivar son similares a las reportadas por estos autores, por lo que al parecer no existe variación en la virulencia del patógeno.

El genotipo *H. fulva* presentó esporulación lenta en algunas de las lesiones cloróticas, fuera del intervalo de evaluación de la resistencia, aproximadamente 28 días después de haber sido inoculado. Parlevliet y van Ommeren (1975) describieron que genotipos con resistencia parcial presentan un tipo de infección susceptible (completa compatibilidad entre el patógeno y su hospedante, lo que indica ausencia de hipersensibilidad) y el periodo de latencia es mucho más prolongado y la frecuencia de infección es menor comparado con un hospedante susceptible. De los experimentos establecidos se pueden apreciar las grandes diferencias en periodo de latencia y en frecuencia de infección (no cuantificada), pero un estudio histológico como los realizados en royas de cereales (Niks, 1983; Moldenhauer *et al.*, 2006) no se hizo para precisar la presencia a nivel microscópico del nivel de reacción y así definir la existencia de una posible resistencia parcial. Basado sólo en los cambios de coloración del tejido del hospedante, los tipos de infección de los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ tienen una resistencia de hipersensibilidad; sin embargo, *H. fulva* al mostrar un PL de aproximadamente 28 días y nula reacción de hipersensibilidad macroscópicamente, podría presentar resistencia parcial *sensu* Parlevliet y van Ommeren (1975), lo cual requiere ser estudiado más profundamente.

frequency (not quantified), but no histological studies, as the studies conducted for cereal rusts (Niks, 1983; Moldenhauer *et al.*, 2006), were conducted to specify the level of reaction and thus define the existence of a possible partial resistance. Based only on the coloration changes in the host’s tissue, the types of infection in ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars have only one type of hypersensitivity resistance. However, *H. fulva*, which showed only one latency period of approximately 28 days and null macroscopically hypersensitivity reaction, could have partial resistance *sensu* Parlevliet (Parlevliet and van Ommeren (1975), but this must be further studied.

The RCH1 and RFOR2 isolates inoculated in the different genotypes caused the same resistance reactions, which indicates that there are no variations in pathogenicity. However, studies conducted by Hernández *et al.* (2002) and Chatasiri *et al.* (2006) indicate that there is proof of variation in the pathogen, because by comparing the ITS region of several isolates coming from different America and Asia geographical areas, they observed genetic differences in the specimens from each continent. However, they point out that a wider sampling is needed in order to determine if there is genetic variability in the fungus.

Inoculation of different *P. hemerocallidis* isolates used in the study conducted by Buck (2013) confirms the presence of pathotypes with a different type of virulence in daylily cultivars in the southern area of the United States. Carvalho *et al.* (2018) report that the absence of the isolate found in Portugal is completely aligned with the sequences from the United States and Costa Rica, but that it differs from the reported sequences from Russia, Japan, Australia and Mexico (sequences reported in the present study).

Rusts are obliged parasites and highly specific to the host specificity; in some rust species the



Los aislamientos RCH1 y RFOR2 inoculados en los diferentes genotipos, indujeron las mismas reacciones de resistencia, lo que indica que no hay variaciones de patogenicidad. Sin embargo, los trabajos de Hernández *et al.* (2002) y Chatasiri *et al.* (2006) indican una evidencia de la variación del patógeno, ya que al comparar la región ITS de varios aislamientos provenientes de diferentes áreas geográficas de América y Asia, observaron diferencias genéticas en los especímenes de cada continente; no obstante, señalan que es necesario un muestreo más amplio para determinar que existe variabilidad genética del hongo.

La inoculación de diferentes aislamientos de *P. hemerocallidis* en el estudio de Buck (2013) confirma la presencia de patotipos que difieren en virulencia en cultivares de lirio de día en el sureste de EE. UU. Además, Carvalho *et al.* (2018) reportan que la secuencia del aislamiento encontrado en Portugal se alinea completamente con las secuencias de EE. UU. y Costa Rica, mientras que es diferente de las secuencias reportadas de Rusia, Japón, Australia y México (secuencias reportadas en el presente estudio).

Las royas son parásitos obligados y altamente específicos al hospedante; en algunas especies de royas, las formas especiales y razas fisiológicas son definidas de acuerdo con la especificidad del hospedante y cultivares (Li *et al.*, 2007). En el caso de *P. hemerocallidis*, no se ha reportado especificidad al hospedante a nivel de razas fisiológicas por lo que, no sería sorprendente la existencia de tal especialización patogénica en este patosistema ya que es similar a aquellos que involucran royas en diferentes cultivos de importancia económica (Leonard y Szabo, 2005; Soto-Estrada *et al.*, 2005; Yáñez *et al.*, 2009), pero es necesario realizar más estudios para demostrar este aspecto.

Se sabe que en las royas macrocíclicas, p.e. roya del tallo (*P. graminis* f. sp. *tritici*) y roya de la hoja del trigo (*P. triticina*) la recombinación ge-

special forms and physiological races are defined according to the host specificity and cultivars (Li *et al.*, 2007). In the case of *P. hemerocallidis*, there are no reports on its host specificity, so it would not be surprising to find such pathogenic specialization in this pathosystem, considering that it is similar to those that involve rusts in different economically important crops (Leonard and Szabo, 2005; Soto-Estrada *et al.*, 2005; Yáñez *et al.*, 2009), but further studies must be conducted to demonstrate this aspect.

It is known that in macrocyclic rusts, including wheat stem rust (*P. graminis* f. sp. *tritici*) and leaf rust (*P. triticina*), the genetic recombination occurs in the alternate host and that this is a mechanism to create new virulence combinations. Since *Patrinia villosa*, an alternate *P. hemerocallidis* host (Ono, 2003), has not been found in Mexico, its possible influence on the development of genetic variation in the fungus is unknown.

In North America, the first report on this rust was submitted by Williams-Woodward *et al.* in 2001, when they detected infected material in the United States. Later, the disease quickly spread across America and it is probably present in all the countries where *Hemerocallis* spp. susceptible cultivars are grown.

## CONCLUSIONS

The fungus that attack *Hemerocallis* susceptible genotypes in Mexico correspond to *P. hemerocallidis*. The *H. lilioasphodelus* species is susceptible; 'Radiant Greetings' and 'Stella d'Oro' cultivars from the *H. hybrida* species were classified as moderately resistant because they showed hypersensitivity resistance; the 'Cherry Wine' cultivar and the *H. fulva* species were included in the group of resistant, the latter probably having partial resistance *sensu* Parlevliet.

nética ocurre en el hospedante alterno y este es un mecanismo para generar nuevas combinaciones de virulencia. Se desconoce la existencia de *Ptrinia villosa* en México, hospedante alterno de *P. hemerocallidis* (Ono, 2003) y por lo tanto, se ignora su posible influencia en la generación de variación genética del hongo.

En América del Norte, el primer reporte de esta roya lo realizaron Williams-Woodward *et al.*, en el año 2001, al observar material infectado en EE.UU. Después se dispersó rápidamente en América y seguramente se encuentra en todos los países donde existan cultivares susceptibles de *Hemerocallis* spp.

## CONCLUSIONES

El hongo que ataca a los genotipos de *Hemerocallis* susceptibles en México corresponde a *P. hemerocallidis*. La especie *H. lilioasphodelus* es susceptible, los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ de la especie *H. hybrida* se clasificaron como moderadamente resistentes al mostrar resistencia de hipersensibilidad; el cultivar ‘Cherry Wine’ y la especie *H. fulva* se agruparon como resistentes, esta última, presenta una probable resistencia parcial *sensu* Parlevliet.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Stephen D. Koch (†) del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados por su ayuda en la identificación de las especies de *Hemerocallis* utilizadas en el presente estudio.

## LITERATURA CITADA

Ahrens U and Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-828>

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Stephen D. Koch (†) of the Colegio de Postgraduados’ Botany Program for their help in identifying the *Hemerocallis* species used in the present study.

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

- Buck JW. 2013. Identification of pathotypes in the daylily rust pathogen *Puccinia hemerocallidis*. *Journal of Phytopathology* 161: 784-790. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12134>
- Carvalho AA Jr, Coutinho LN and Figueiredo MB. 2001. A primeira constatação da ferrugem do lírio-de-São-José nas Américas. *Arquivos do Instituto Biológico* 68:55.
- Carvalho R, Silva E, Loureiro J, Ramos AP and Talhinhos P. 2018. Characterisation of *Puccinia hemerocallidis* causing the first outbreak of daylily rust in Europe. *Revista de Ciências Agrárias* 41: 110-115. <https://doi.org/10.19084/RCA.17075>
- Chatasiri S, Kitade O and Ono Y. 2006. Phylogenetic relationships among *Puccinia hemerocallidis*, *P. funkiae*, and *P. ptriniae* (Uredinales) inferred from ITS sequence data. *Mycoscience* 47:123-129. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0283-Y>
- Cummins GB and Hiratsuka Y. 1996. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. APS Press. St. Paul, Minnesota. 152 p.
- Grosvenor G. 1999. *Daylilies for the Garden*. Timber Press. Portland, Oregon. 176 p.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Hernández JR, Palm ME and Castlebury LA. 2002. *Puccinia hemerocallidis*, cause of daylily rust, a newly introduced disease in the Americas. *Plant Disease* 86: 1194-1198. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1194>
- Hiratsuka N, Sato T, Katsuya K, Kakishima M, Hiratsuka Y, Kaneko S, Ono Y, Sato S, Harada Y, Hiratsuka T and Nakayama K. 1992. *The Rust Flora of Japan*. Tsukuba Shuppankai, Ibaraki, Japan. pp: 710-711.
- Jones DD and Clifford BC. 1983. *Cereal Diseases. Their Pathology and Control*. John Wiley & Sons Ltd. 309 p.
- Leonard KJ and Szabo LJ. 2005. Pathogen profile: Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology*. 6: 99-111. pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=38317&content=PDF
- Li YH, Windham MT, Trigliano RN, Fare DC, Spiers JM and Copes WE. 2007. Microscopic and macroscopic studies of the development of *Puccinia hemerocallidis* in resistant and susceptible daylily cultivars. *Plant Disease* 91: 664-668. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0664>
- Moldenhauer J, Moerschbacher BM and Van Der Westhuizen AJ. 2006. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) development in resistant and

- susceptible wheat cultivars. *Plant Pathology* 55: 469-474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01385.x>
- Mostert L, Bester W, Coertze S and Wood AR. 2008. First report of daylily rust caused by *Puccinia hemerocallidis* in the Western Cape Province of South Africa. *Plant Disease* 92: 1133. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1133A>.
- Mueller DS, Williams-Woodward JL and Buck JW. 2003. Resistance of daylily cultivars to the daylily rust pathogen, *Puccinia hemerocallidis*. *Horticultural Science* 38: 1137-1140. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.6.1137>
- Munson Jr RW. 1989. *Hemerocallis*, The daylily. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. 144 p.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Niks RE. 1983. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost plant genotypes. *Phytopathology* 73: 64-66. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-64>
- Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P and Bai Y. 2011. Breeding crops with resistance to diseases and pests. Department of Plant Breeding. Wageningen Agricultural University. The Netherlands. 200 p. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-171-2>
- Ono Y. 2003. Does *Puccinia hemerocallidis* regularly host-alternate between *Hemerocallis* and *Patrinia* plants in Japan? *Journal of General Plant Pathology*. 69: 240-243. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0047-x>
- Pardo-Cardona VM. 2006. Uredinales de plantas cultivadas de interés floral en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 59: 3335-3353. <http://www.scielo.org.co/scielo>
- Pardo-Cardona VM, Caruso D y Rojas T. 2008. Primer registro para Venezuela de *Puccinia hemerocallidis* Thüm., la roya del lirio de la mañana. *Agronomía Tropical* 58: 193-196. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2797069>
- Parlevliet JE and van Ommeren A. 1975. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. II. Relationship between field trials, microplot tests and latent period. *Euphytica* 24: 293-303. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00028194>
- Silva E, Carvalho R, Nunes N, Ramos AP and Talhinhos P. 2016. First report of *Puccinia hemerocallidis* causing daylily rust in Europe. *Plant Disease* 100: 2163. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0242-PDN>
- Smith IM. 2009. *Puccinia hemerocallidis*. *Bulletin OEPP/EPPO* 39:48-50. https://gd.eppo.int/doc/601_ds_PUC-CHM_en
- Soto-Estrada A, Förster H, DeMason DA and Adaskaveg JE. 2005. Initial infection and colonization of leaves and stems of cling peach by *Tranzschelia discolor*. *Phytopathology* 95: 942-950. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0942>.
- Williams-Woodward JL, Hennen JF, Parda KW and Fowler JM. 2001. First report of daylily rust in the United States. *Plant Disease* 85: 1121. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1121C>
- Yáñez MMJ, Alanis MI, Soto RJM, Malvick DK, Kurle JE, Floyd CM and Krupa SV. 2009. Soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* detected in the state of Campeche on the Yucatan Peninsula, Mexico. *Plant Disease* 93: 847. <http://dx.doi.org/doi:10.1094/PDIS-93-8-0847A>.

Pathosystem *Solanum lycopersicum*-*Phytophthora infestans* in Chapingo, Mexico. Expected, observed and simulated

Patosistema *Solanum lycopersicum*-*Phytophthora infestans* en Chapingo, México. Esperado, observado y simulado

Lucio Delesma-Morales, Héctor Lozoya-Saldaña*, J. Enrique Rodríguez-Pérez, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230, México; Jaime B. Díaz-de la Cruz, Probiobiodiversidad AC, Manuel Gonzalez 219A, Texcoco, Estado de México, C.P. 56116, México. * Autor para correspondencia: picti87@gmail.com

Recibido: 29 de Octubre, 2019.

Aceptado: 27 de Noviembre, 2019.

Delesma-Morales L, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Pérez JE and Díaz-de la Cruz JB. 2020. Pathosystem *Solanum lycopersicum*-*Phytophthora infestans* in Chapingo, Mexico. Expected, observed and simulated. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 40-61.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1910-5

Primera publicación DOI: 09 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 09, 2019.

Resumen. *Phytophthora infestans* es afectado por factores bióticos y abióticos que pueden hacer variar su patogenicidad. En tierras altas de México, la variabilidad genética de *P. infestans*, bajas temperaturas, alta humedad relativa y luz favorecen su expresión e influyen en la eficacia de la infección. Este trabajo analizó el progreso de infección de *P. infestans* respecto a lo esperado, observado y simulado durante dos ciclos de campo en Chapingo, México, con el objetivo de documentar y cuantificar el progreso de la infección foliar por *P. infestans* en diferentes líneas de jitomate con diferentes niveles de resistencia. Así como validar un modelo predictivo.

Abstract. *Phytophthora infestans* is affected by biotic and abiotic factors that can vary its pathogenicity. In the highlands of Mexico, the genetic variability of *P. infestans*, low temperatures, high relative humidity and light favor its expression and influence the efficacy of the infection. This work analyzed the progress of infection of *P. infestans* with respect to the expected, observed and simulated during two field cycles in Chapingo, Mexico, with the objective of documenting and quantifying the progress of foliar infection by *P. infestans* in different lines of Tomato with different levels of resistance. As well as validate a predictive model. With the record of 10 years of meteorological data, five situations were predicted with four to ten cycles of infection from 8 to 13 h each. Compared to the predictions, the observed effect of area under the disease progress curve (AUDPC) and its components (RAUDPC and RaRAUDPC) were significant, with low coefficient of variation. It is concluded that among the expected, observed and simulated scenarios there is a close relationship to predict epidemics of *P. infestans*. This confirms that LATEBLIGHT is useful for simulating and

Con el registro de 10 años de datos meteorológicos, se predijeron cinco situaciones con cuatro a diez ciclos de infección de 8 a 13 h cada uno. En comparación con las predicciones, el efecto observado de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) y sus componentes (RAUDPC y RaRAUDPC) fueron significativos, con bajo coeficiente de variación. Se concluye que entre los escenarios esperados, observados y simulados existe una estrecha relación para predecir epidemias de *P. infestans*. Esto confirma que LATEBLIGHT es útil para simular y predecir la epidemia de tizón tardío, en condiciones atmosféricas de Chapingo.

Palabras clave: susceptibilidad, resistencia, tizón tardío, escenarios de infección

La cantidad y calidad de la producción en el cultivo de jitomate disminuye por efecto de las enfermedades provocando pérdidas millonarias (Johnson *et al.*, 2015; Collinge *et al.*, 2010; Saville *et al.*, 2015; Childers *et al.*, 2015). La interacción patógeno-hospedero es afectada por factores bióticos y abióticos. Los primeros incluyen resistencia, heterogeneidad y demografía del hospedero, así como densidad, frecuencia y relación genética de genotipos del patógeno coexistente (Zhan y McDonald, 2013). El principal patógeno del jitomate es *Phytophthora infestans* y diversos factores pueden incrementar su patogenicidad (Dudler, 2013; Schornack *et al.*, 2013; Berdúo-Sandoval *et al.*, 2019). La migración de sus dos tipos de apareamiento (A1 y A2) provocan su reproducción sexual incrementando su variabilidad genética (Skelsey *et al.*, 2009). En tierras altas de México, la variabilidad genética de *P. infestans*, bajas temperaturas (10-15 °C) y alta humedad relativa (> 90% 10 h día⁻¹) son favorables para su expresión patogénica (Díaz *et al.*, 2014). El patrón de dispersión del patógeno también depende

predicting the late blight epidemic, under Chapingo atmospheric conditions.

Key words: Resistance, Susceptibility, Lateblight, Scenario of infection

The amount and quality of production in tomato crops has diminished due to diseases, causing extremely costly losses (Johnson *et al.*, 2015; Collinge *et al.*, 2010; Saville *et al.*, 2015; Childers *et al.*, 2015). The pathogen-host interaction is affected by biotic and abiotic factors. The former include resistance, heterogeneity and demography of the host, as well as density, frequency, and the genetic relation between genotypes of the coexisting pathogen (Zhan and McDonald, 2013). The main pathogen of the tomato is *Phytophthora infestans* and diverse factors can increase its pathogenicity (Dudler, 2013; Schornack *et al.*, 2013; Berdúo-Sandoval *et al.*, 2019). The migration of its two mating types (A1 and A2) lead to its sexual reproduction, increasing its genetic variability (Skelsey *et al.*, 2009). In the highlands of Mexico, the genetic variability of *P. infestans*, low temperatures (10-15 °C) and high relative humidity (> 90% 10 h día⁻¹) are favorable for its pathogenic expression (Díaz *et al.*, 2014). The dispersal pattern of the pathogen also depends on the location of the field, spatial distribution, duration of the survival of spores (Skelsey *et al.*, 2010), and solar radiation (Skelsey *et al.*, 2009). The release of sporangia is broadly and directly related to low levels of solar radiation, temperature and a high relative humidity (Díaz *et al.*, 2014).

Temperature and relative humidity have a significant impact on the development of late blight. Differential effects such as rainfall, wind, relative humidity, temperature and light can influence the efficiency of sporangia to trigger the infection (Ojiambo *et al.*, 2015), and are therefore important

de la ubicación del campo, distribución espacial, duración de supervivencia de esporas (Skelsey *et al.*, 2010), y radiación solar (Skelsey *et al.*, 2009). La liberación de esporangios está correlacionada estrecha y directamente con niveles bajos de radiación solar, temperatura y alta humedad relativa (Díaz *et al.*, 2014).

La temperatura y humedad relativa tienen un impacto significativo en el desarrollo del tizón tardío. Los efectos diferenciales, como lluvia, viento, humedad relativa, temperatura y luz pueden influir en la eficacia de esporangios para iniciar la infección (Ojiambo *et al.*, 2015) siendo importantes para la epidemiología y manejo de la enfermedad (Danies *et al.*, 2013). En condiciones climáticas favorables para el patógeno, el cultivo de jitomate puede destruirse en cuestión de días (Hu *et al.*, 2012) y cuando las condiciones son desfavorables puede reducirse su incidencia y/o severidad (Bostock *et al.*, 2014). Predecir la enfermedad necesita una sólida comprensión de la relación entre datos climáticos y desarrollo de la enfermedad (Yuen y Mila, 2015). “LATEBLIGHT” es un modelo predictivo que evalúa enfermedades policíclicas de hojas y predice el nivel de resistencia genética (Forbes *et al.*, 2008; Yuen y Forbes, 2009). Estudios no definen el momento y la cantidad de infección inicial por varias razones, incluidas las limitaciones de tiempo relacionadas con el inicio de la epidemia después del trasplante (Andrade-Piedra *et al.*, 2005a; Díaz *et al.*, 2014). El área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) permite cuantificar el grado de resistencia genética a *P. infestans* en condiciones de campo, a través de la estimación del área bajo la curva de infección real. AUDPC relativo (RAUDPC) se usa para comparar el progreso de la enfermedad en diferentes condiciones ambientales o cuando se comparan más de una estación de crecimiento (Díaz *et al.*, 2014).

Phytophthora infestans exhibe un amplio rango de diversidad genética en Chapingo, México

for the epidemiology and the management of the disease (Danies *et al.*, 2013). Under favorable weather conditions for the pathogen, the tomato crop can be destroyed in a matter of days (Hu *et al.*, 2012) and when conditions are unfavorable, its incidence and/or severity can be reduced (Bostock *et al.*, 2014). Predicting the disease requires a solid comprehension of the relation between weather data and the development of the disease (Yuen and Mila, 2015). “LATEBLIGHT” is a predictive model that evaluates polycyclic leaf diseases and predicts the level of genetic resistance (Forbes *et al.*, 2008; Yuen and Forbes, 2009). Studies do not define the moment and amount of initial infection for several reasons, including the time limitations related to the beginning of the epidemic after transplanting (Andrade-Piedra *et al.*, 2005a; Díaz *et al.*, 2014). The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) helps quantify the genetic resistance to *P. infestans* under field conditions, by estimating the real area under the curve of the disease. The Relative AUDPC (RAUDPC) is used to compare the progress of the disease under different environmental conditions, or when comparing more than one growth season (Díaz *et al.*, 2014)

Phytophthora infestans displays a wide range of genetic diversity in Chapingo, Mexico (Alarcón-Rodríguez *et al.*, 2014). This region has a wide season of constant summer rains, which guarantees the natural infection of late blight. Under these conditions and evaluating the genetic resistance of various tomato lines, the present study was carried out with the aim of documenting the progress of the foliar infection caused by *P. infestans* in different lines of tomato with different levels of genetic resistance under three scenarios: (1) expected, based on the AUDPC derived from the historical means of variables; (2) direct observations in the field and (3) simulated, using the predictive mathematical model “LATEBLIGHT,” version LB2004.

(Alarcón-Rodríguez *et al.*, 2014). Esta región tiene una temporada de lluvias de verano constante, lo que garantiza la infección natural del tizón tardío. Bajo estas condiciones y evaluando la resistencia genética de varias líneas de jitomate, se realizó el presente estudio con el objetivo de documentar y cuantificar el progreso de la infección foliar por *P. infestans* en diferentes líneas de jitomate con diferentes niveles de resistencia genética, bajo tres escenarios: (1) esperado, basado en el AUDPC derivado de promedios históricos de variables; (2) observaciones directas de campo, y (3) simulado, utilizando el modelo matemático predictivo “LATEBLIGHT” versión LB2004.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. Chapingo se encuentra a 2,250 m sobre el nivel del mar (19° 30' latitud norte y 98° 53' longitud oeste) en el Estado de México. Tiene clima Cb (Wo) con temperatura anual promedio de 15.2 °C y precipitación anual de 635.5 mm (García, 1987). Las temporadas de cultivo en esta región dependen de la lluvia y se extienden desde mediados de junio hasta mediados de octubre.

Patosistema Jitomate/Tizón. El patosistema de *P. infestans*-jitomate se estudió bajo condiciones climáticas de Chapingo, Estado de México durante dos ciclos de cultivo (2017 y 2018) en un periodo de cinco semanas que comprendieron los meses de agosto y septiembre, utilizando tres escenarios: (1) esperado, (2) observado y (3) simulado. En el experimento se utilizó un control (río grande) y seis líneas de jitomate (L-03, L-51, L-72, L-92, L-43, L-77). El escenario esperado consiste en la obtención de la cantidad de posibles ciclos de infección de *P. infestans* que podrían existir durante el ciclo de cultivo. Este se obtiene del análisis

MATERIALS AND METHODS

Site of study. Chapingo is located at 2,250 m over sea level (19° 30' latitude north and 98° 53' longitude west), in the State of Mexico. Its weather is Cb (Wo) with an annual average temperature of 15.2 °C and an annual rainfall of 635.5 mm (García, 1987). Planting seasons in this region depend on rainfalls and last from mid-June to mid-October.

Tomato/blight pathosystem. The *P. infestans*-tomato pathosystem was studied under the weather conditions in Chapingo, State of Mexico during two planting cycles (2017 and 2018) in a period of five weeks, which ran between the months of August and September, using three scenarios: (1) expected, (2) observed and (3) simulated. In the experiment, we used a control (Rio grande) and six tomato lines (L-03, L-51, L-72, L-92, L-43, L-77). The expected scenario consisted in obtaining the amount of possible *P. infestans* infection cycles that could exist during the planting cycle. This is obtained from analyzing the association of weather variables with factors that influence the progress of *P. infestans* (Díaz *et al.*, 2014). The observed scenario is the progress of the real infection of *P. infestans* during a particular plantation cycle. This consists of the evaluation of readings of the infection of the foliage using the Henfling scale to obtain the AUDPC (Henfling, 1987). The simulated scenario consists of the prediction of the AUDPC using the “LATEBLIGHT” algorithm, which is executed with the supply of data on weather parameters, resistance of the host and epidemiological variables (Díaz *et al.*, 2014; Andrade-Piedra *et al.*, 2005b; Andrade-Piedra *et al.*, 2005c).

Agronomic crop management. In 2017, seeds were planted on May 23 and transplanted on June 21. On both dates, seeds were planted in

de la asociación de variables meteorológicas con factores que influyen en el progreso de *P. infestans* (Díaz *et al.*, 2014). El escenario observado es el progreso de infección real de *P. infestans* durante un ciclo de cultivo determinado. Este consiste en la evaluación de lecturas de infección del follaje utilizando la escala de Henfling para así obtener el AUDPC (Henfling, 1987). El escenario simulado consiste en la predicción del AUDPC utilizando el algoritmo “LATEBLIGH” el cual se ejecuta con el suministro de datos de parámetros climáticos, resistencia del hospedero y variables epidemiológicas (Díaz *et al.*, 2014; Andrade-Piedra *et al.*, 2005b; Andrade-Piedra *et al.*, 2005c).

Manejo agronómico del cultivo. En 2017 la semilla se sembró el 13 de mayo y fueron trasplantadas el 16 de junio. En 2018 la semilla se sembró el 14 de mayo y trasplanto el 21 de junio. En ambas fechas la semilla se plantó en charolas de unicel de 200 cavidades. El trasplante para ambas fechas se realizó en unidades experimentales conformadas por tres surcos con un área de 12 m² de cada unidad experimental. El experimento se ubicó en el lote X-2 del campo agrícola experimental Xaltepa de la Universidad Autónoma Chapingo. Se realizaron riegos de auxilio cuando el cultivo lo requería mediante la utilización de cintilla (calibre ocho mil, con goteros cada 20 cm y con un gasto por emisor de 1.02 litro•h⁻¹.); se aplicó fertilización granulada N, P, K (46-00-00; 18-46-00; 00-00-60). Se aplicó fertilización foliar de micro elementos (Tradecorp AZ). Para el control de plagas se aplicó flonicamid y cipermetrina. El control de malezas fue manual. De acuerdo a la etapa fenológica del cultivo se le dio soporte a la planta con rafias de nilón.

Escenario esperado. Se analizaron seis variables meteorológicas sobre el desarrollo del tizón tardío (Cuadro 1), mediante la aplicación regresión lineal

styrofoam trays with 200 holes. The transplants for both dates were carried out in experimental units composed of three furrows, with an area of 12 m² in each experimental unit. The experiment was located in lot X-2 of the Xaltepa experimental field of the Autonomous University Chapingo. The auxiliary irrigations were performed using a drip tape (caliber eight thousand, with drippers every 20 cm and a flow of 1.02 L h⁻¹ per emitter) when required by the crop; granulated N, P, K fertilizer was applied (46-00-00; 18-46-00; 00-00-60). Foliar fertilizer of microelements was applied (Tradecorp AZ). For pest control, we applied flonicamid and cypermethrin. Weed control was performed by hand. Depending on the phenological stage of the crop, the plant was provided support with nylon raffias.

Expected scenario. Six weather variables (Table 1) on the development of late blight were analyzed by multiple linear regression (SAS, 2002). The selection of the best model, with a minimum independence variability, was based on the criterion of the highest determination coefficient. The weather data were related with conditions that can impact the survival, permanence and dissemination of *P. infestans* (Andrade-Piedra *et al.*, 2005c; Iglesias *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2011; Nowicki *et al.*, 2012; Skelsey *et al.*, 2009; Skelsey *et al.*, 2010). Temperature (T), relative humidity (RH) and solar radiation (SR) were chosen to determine the expected scenarios, considering their greatest contribution to the development of the disease.

Observed scenario. Six tomato lines were evaluated, along with a control and two levels of susceptibility (S = susceptible, R = resistant, C= control); L-03 (S), L-51 (S), L-72 (S), L-92(S), L-43 (R), L-77(R), and Rio grande (C) (Leyva *et*

Cuadro 1. Valores límites mínimos y máximos de los intervalos de las variables meteorológicas registradas de Junio 1 a septiembre 30, de 2007 a 2016 en Chapingo, México.

Table 1. Maximum and minimum limit values of the intervals of the weather variables registered between June 1 and September 30, 2007 to 2016 in Chapingo, Mexico.

| Variable | Abreviación | Unidad | 80%≤HR≤90%
Rango | HR>90%
Rango |
|-----------------------------|-------------|------------------|---------------------|-------------------|
| Temperatura | T | °C | 12.7-17.6 | 12.7-16.3 |
| Punto de rocío | PR | | 12.1-16.7 | 12.3-16 |
| Precipitación | PP | mm | 0-47.1 | 2.8-21.4 |
| Velocidad del viento | VV | ms ⁻¹ | 0-1 | 0-1.5 |
| Velocidad máxima del viento | VMV | ms ⁻¹ | 0-1 | 0-6.3 |
| Radiación solar acumulada | RS | W m ² | 3018 ^y | 1701 ^z |

^y acumulado durante 23.5 h, de 00:00 a 23:30, 3,606 W m⁻² ≈ 12.982 MJ m⁻² ♦ ^y acumulado durante 23.5 h, de 00:00 a 23:30, 3,606 W m⁻² ≈ 12.982 MJ m⁻²

^z acumulado durante 3 h, de 06:00 a 09:00, 1,025 W m⁻² ≈ 3.69 MJ m⁻² ♦ ^z acumulado durante 3 h, de 06:00 a 09:00, 1,025 W m⁻² ≈ 3.69 MJ m⁻²

múltiple (SAS, 2002). La selección del mejor modelo, con variabilidad mínima de independencia, se basó en el criterio del coeficiente de determinación más alto. Los datos meteorológicos se asociaron con condiciones que influyen en la supervivencia, permanencia y diseminación de *P. infestans* (Andrade-Piedra *et al.*, 2005c; Iglesias *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2011; Nowicki *et al.*, 2012; Skelsey *et al.*, 2009; Skelsey *et al.*, 2010). Temperatura (T), humedad relativa (HR) y radiación solar (RS) fueron seleccionadas para determinar los escenarios esperados considerando su mayor contribución al desarrollo de la enfermedad.

Escenario observado. Se evaluaron seis líneas de jitomate y un control con dos niveles de susceptibilidad (S = susceptible, R = resistente, C= control); L-03 (S), L-51 (S), L-72 (S), L-92(S), L-43 (R), L-77(R), y río grande (C) (Leyva *et al.*, 2013). Durante el ciclo del cultivo se fertilizaron las plantas, se realizó el control de malezas y plagas. En campo fueron evaluados con un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones (5 m de largo, 0.80 m entre filas y 0.40 m entre plantas). Las lecturas semanales de infección de follaje

al., 2013). During the planting cycle, the plants were fertilized and the pest and weed controls were carried out. They were evaluated in the field with a complete random block experimental design with four repetitions (5 m in length, 0.80 m between furrows and 0.40 m between plants). The weekly readings of foliar infection were evaluated with the Henfling scale (Henfling, 1987) for a five-week period between August and September, 2017 and 2018, once the pathogen appeared naturally. Based on the initial symptoms after transplanting, the AUDPC was calculated progressively (Shaner and Finney, 1977). The values derived from AUDPC were used to calculate the RAUDPC (Fry, 1978; Bonierbale *et al.*, 2010). Finally, the RAUDPC values were used to calculate the RaRAUDPC, using line 92 as the reference, which was possible during the experiment, following the procedure described by Yuen and Forbes (2009) and Taipe *et al.* (2011).

Simulated scenario. An algorithm named LATEBLIGH was produced using “SAS for Windows 9.0” (SAS, 2002) considering the weather parameters and the level of the host

se evaluaron con la escala de Henfling (Henfling, 1987) en un periodo de cinco semanas comprendidas entre agosto y septiembre de los años 2017 y 2018 una vez que el patógeno se presentó de forma natural. Con base en síntomas iniciales después del trasplante, el AUDPC se calculó progresivamente (Shaner y Finney, 1977). Los valores derivados del AUDPC se usaron para calcular RAUDPC (Fry, 1978; Bonierbale *et al.*, 2010). Finalmente, los valores de RAUDPC se usaron para calcular RaAUDPC, utilizando como referencia la línea 92 que fue susceptible durante el experimento, siguiendo el procedimiento descrito por Yuen y Forbes (2009) y Taipe *et al.* (2011).

Escenario simulado. Se elaboró un algoritmo denominado LATEBLIGH en el “Sistema SAS para Windows 9.0” (SAS, 2002) considerando parámetros climáticos y nivel de resistencia del hospedero dentro de 2.4 m² de plantas de jitomate, basado en formularios reportados por Díaz *et al.* (2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Escenarios esperados. Al seleccionar el modelo de regresión lineal múltiple para la realización de los escenarios esperados se encontró que temperatura (T), humedad relativa (HR) y radiación solar (RS) fueron variables independientes que presentaron el mayor coeficiente de determinación ($R^2 = 0.44$). Estas variables están asociadas con la presencia, diseminación y efectividad de *P. infestans*. Se registraron variables meteorológicas en un periodo de 10 años (2007-2016) y se promediaron en el gráfico de tendencia. En el Cuadro 1, se muestran los registros promedio mínimo y máximo de variables meteorológicas derivadas de la aplicación de dos criterios de selección para HR ($80\% \leq HR \leq 90\%$ y $HR > 90\%$). El límite superior de los registros promedio

resistente del hospedero dentro de 2.4 m² de plantas de jitomate, basado en los datos reportados por Díaz *et al.* (2014).

RESULTS AND DISCUSSION

Expected scenarios. When selecting the multiple regression model for the execution of the expected scenarios, temperature (T), relative humidity (RH) and solar radiation (SR) were found to be independent variables that presented the highest coefficient of determination ($R^2 = 0.44$). These variables are related to the presence, dissemination and effectiveness of *P. infestans*. Weather variables were recorded for a 10-year period (2007-2016) and averaged out in the tendency graph. Table 1 shows the minimum and maximum average records for weather variables derived from the application of two selection criterion for RH ($80\% \leq RH \leq 90\%$ and $RH > 90\%$). The upper limit of the average T, RH and SR records under the criterion of the $80\% \leq RH \leq 90\%$ was used to explain both the variability and the effect of these variables on the development of late blight. This comparison was made using the weather parameters for the expected scenarios with RH for 23.5 h and T 15.9 °C favoring the presence, dissemination and effectiveness of *P. infestans*, in comparison with the upper levels of the mean (Andrade-Piedra, *et al.*, 2005c; Iglesias *et al.*, 2010). Based on the conditions obtained through T, RH and SR as the best multiple linear model, highest peak fluctuation and selection criterion $80\% \leq RH \leq 90\%$, five expected scenarios were identified, with ranges of four to ten infection cycles of variable lengths ranging from 6 to 12 h by night, dawn and sunrise (19:00 to 08:00). Figure 1 shows the infection cycles of the expected scenarios (I to V). The tendency curves (high and low peaks) are joined for the three variables (T, RH and SR). Both the beginning and the end of each

de T, HR y RS bajo el criterio del $80\% \leq RH \leq 90\%$ se utilizó para explicar tanto la variabilidad como el efecto de estas variables en el desarrollo del tizón tardío. Esta comparación se hizo utilizando los parámetros meteorológicos para los escenarios esperados con HR durante 23.5 h y T 15.9 °C favoreciendo la presencia, difusión y efectividad de *P. infestans*, en comparación con los límites superiores de la media (Andrade-Piedra, *et al.*, 2005c; Iglesias *et al.*, 2010). Basado en las condiciones obtenidas a través de T, HR y RS como el mejor modelo lineal múltiple, mayor pico fluctuación y selección de criterio $80\% \leq RH \leq 90\%$, se identificaron cinco escenarios esperados con rangos de cuatro a diez ciclos de infección de longitud variable de 6 a 12 h por la noche, en la madrugada y al amanecer (19:00 a 08:00). En la Figura 1, se presentan los ciclos de infección de los escenarios esperados (I a V). Las curvas de tendencia (picos altos y bajos) se unen para las tres variables (T, HR y RS). El principio como el final de cada ciclo de infección está determinado por la disminución de la HR e incremento en la T, basado en intervalos diarios de 60 min. Se requiere clima frío y húmedo para el desarrollo de una mayor cantidad de inóculo en un corto período de Tiempo (Kamoun y Smart, 2005). La oscuridad favorece la esporulación (Nowicki *et al.*, 2012) y la expresión de los patógenos en Chapingo (Díaz *et al.*, 2014). La severidad fue favorecida con T de 9.9 a 16.1 °C y HR de 80.4 a 100% durante 8 h en el cultivo de jitomate desde el 1 de junio hasta el 18 de septiembre (Cuadro 2). Estas condiciones favorecen el inicio de una epidemia con temperaturas nocturnas por debajo del punto de condensación durante al menos 4 h y baja temperatura nocturna igual o superior a 10 °C (Díaz *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2011; Nowicki *et al.*, 2012). Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los registros promedio para las variables meteorológicas T y HR en los cinco escenarios esperados analizados.

cycle are determined by the reduction of the RH and the increase in T, based on daily intervals of 60 min. A cold and humid weather is required for the development of a greater amount of inoculant in a short timeframe (Kamoun and Smart, 2005). Darkness favors sporulation (Nowicki *et al.*, 2012) and the expression of the pathogens in Chapingo (Díaz *et al.*, 2014). The severity was favored with a T of 9.9 to 16.1 °C and an RH of 80.4 to 100% for 8 h in the tomato crop between June 18 and September 18 (Table 2). These conditions favor the beginning of an epidemic with temperatures at night below the condensation point for at least 4 h and a low temperature at night of 10 °C or below (Díaz *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2011; Nowicki *et al.*, 2012). Significant differences ($p < 0.05$) were observed between average registers for weather variables T and RH in the five expected scenarios analyzed.

Observed scenarios. In 2017 the genetic tolerance of Río grande and Line 77 was better than that of the tolerant Lines (Line 92 and Line 72), which were used as references in the initial progress of *P. infestans*, and in 2018, the expression of the tolerant line (Río grande) was greater to that of susceptible lines (Line 43, Line 51). In 2017, the infection observed in the field began on that same day, which led to the idea that both lines are susceptible to *P. infestans* under favorable conditions of RH and TR. Likewise, in 2018, the infection in lines 92 and Río grande began on the same day with a similar infection speed in comparison with 2017 according to the weather plan of conditions of that year (Figure 2). Weather conditions were favorable for the infection of leaves in susceptible lines. On days 90-91 after transplanting (ddt), plants of susceptible lines were infected by 73 % in 2017. A similar lag in the infection rates was also reported by Cadena-Hinojosa *et al.* (2007).

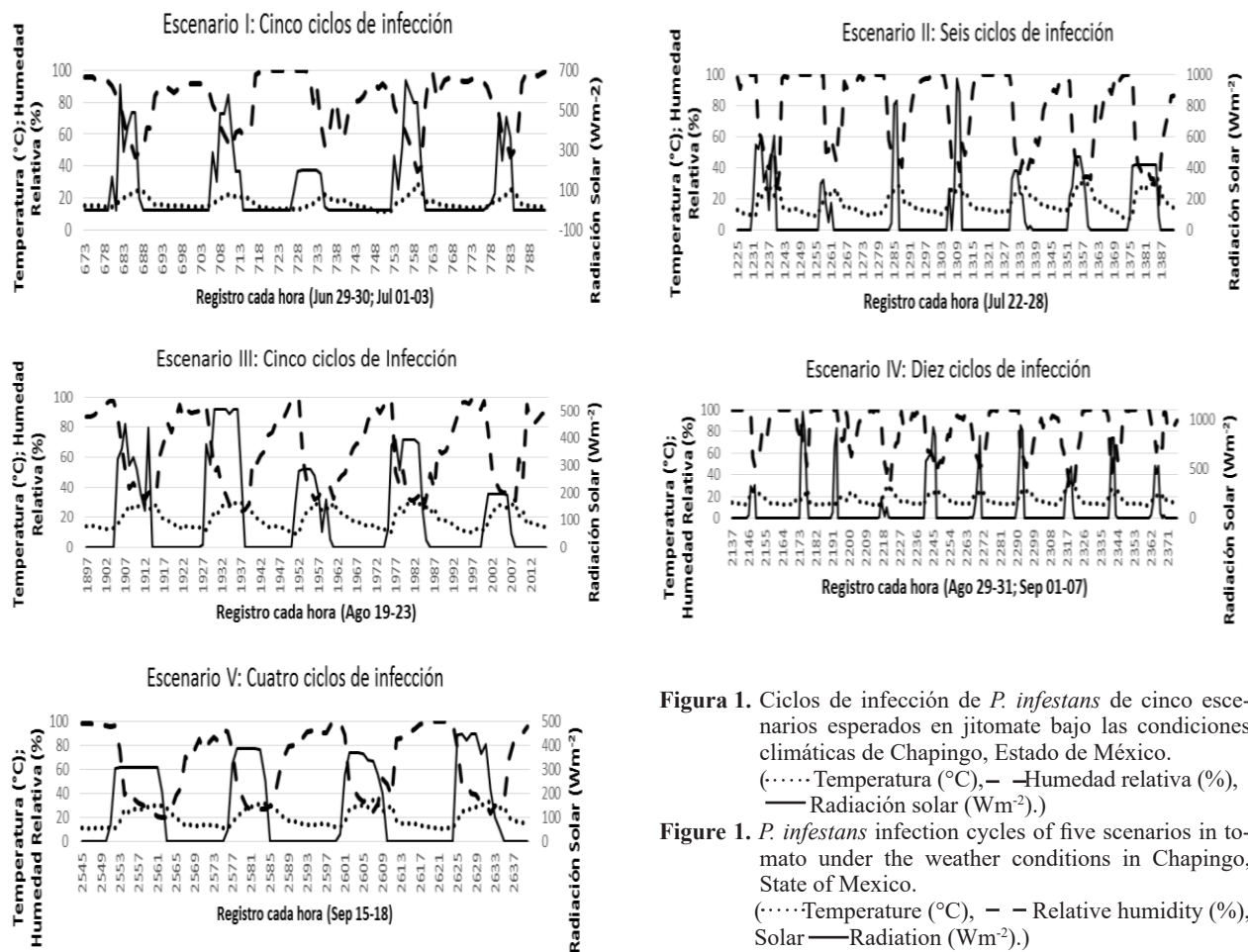


Figura 1. Ciclos de infección de *P. infestans* de cinco escenarios esperados en jitomate bajo las condiciones climáticas de Chapingo, Estado de México. (····· Temperatura (°C), - - - Humedad relativa (%), — Radiación solar (Wm⁻²).

Figure 1. *P. infestans* infection cycles of five scenarios in tomato under the weather conditions in Chapingo, State of Mexico. (·····Temperature (°C), - - - Relative humidity (%), Solar —Radiation (Wm⁻²).

Escenarios observados. En 2017, la tolerancia genética de Río grande y Línea 77 fue mejor a las Líneas susceptibles (Línea 92 y Línea 72) las cuales fueron utilizadas como referencias en el progreso inicial de *P. infestans* y en 2018, la expresión de la línea tolerante (Río Grande) fue mayor a líneas susceptibles (Línea 43, Línea 51). En 2017, la infección observada en campo inició el mismo día, dando la idea de que ambas líneas son susceptible a *P. infestans* bajo condiciones favorables de HR y TR. De igual manera en 2018, la infección en la línea 92 y Río grande inició el mismo día con una velocidad similar de infección en comparación con 2017 acorde con el plan meteorológico de con-

The progress of the infection of Line 92 (plants dead 100–104 ddt displayed the presence of favorable weather conditions for the dissemination of the pathogen, with a temperature of 10.6-15.4 °C, RH of 83-98% for 12 h during the night, dawn and part of the morning (20:00 to 08.00 h) coinciding with the expected VI-4 scenario. However, in 2018, the infection began and progressed later (in approximately 79-81 ddt) in comparison to 2017, with 12-16.2 °C, 90-99% RH, which coincides with scenarios 6, 7, 8 (Table 3).

In 2018, plants present no infection at 95-96 ddt, 10-14.6 °C, and 100 % RH for 12 h in the nighttime, dawn and sunrise (20:00-08:00 h), making it similar

Cuadro 2. Escenarios esperados y ciclos de infección por escenario para *P. infestans* en jitomate bajo las condiciones climáticas de Chapingo.**Table 2.** Expected scenarios and infection cycles by scenario for *P. infestans* in tomato under the weather conditions in Chapingo.

| Escenario | Ciclo de infección | Número de horas ^y | Días Julianos | Horario | Variables meteorológicas | | | |
|-----------------|--------------------|------------------------------|---------------|-------------|--------------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| | | | | | H_h ^z | T | HR | RS |
| I | 1 | 673-681 | 11-12 | 24:00-08:00 | 8 | 14.4-15.2 | 84.6-96 | 166.8 |
| | 2 | 692-704 | 12-13 | 19:00-07:00 | 12 | 14.3-15.5 | 85.7-92.9 | 289.4 |
| | 3 | 716-727 | 13-14 | 19:00-06:00 | 11 | 13-14.5 | 98.4-100 | 83.7 |
| | 4 | 743-753 | 15-16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.5-15.5 | 80.4-91.7 | 269 |
| | 5 | 766-777 | 16-17 | 21:00-08:00 | 11 | 14.1-15.6 | 90.8-94.8 | 16.6 |
| Promedio | | | | | 10.4 | 13.6b-15.2a | 87.9a-95b | 165.1 |
| II | 1 | 1244-1257 | 35-36 | 19:00-08:00 | 13 | 10.3-13.9 | 100-100 | 298.4 |
| | 2 | 1268-1281 | 36-37 | 19:00-08:00 | 13 | 12.1-14.3 | 91.1-97.9 | 46.05 |
| | 3 | 1293-1306 | 37-38 | 20:00-09:00 | 13 | 12.1-14.4 | 91.3-99.5 | 264.65 |
| | 4 | 1318-1330 | 38-39 | 21:00-09:00 | 12 | 12-13.7 | 98.5-100 | 331.85 |
| | 5 | 1341-1352 | 39-40 | 20:00-07:00 | 11 | 12.7-15.2 | 82.2-97.2 | 219.95 |
| | 6 | 1365-1375 | 40-41 | 20:00-07:00 | 11 | 12-16.1 | 83.3-94.7 | 91.02 |
| Promedio | | | | | 12 | 11.8b-14.6a | 91a-98.2ab | 190.04 |
| III | 1 | 1897-1905 | 62-63 | 00:00-09:00 | 8 | 11.9-15.3 | 85.4-97.6 | 323.84 |
| | 2 | 1916-1927 | 63-64 | 19:00-06:00 | 11 | 11.4-15.2 | 85-95.9 | 8.39 |
| | 3 | 1943-1951 | 64-65 | 22:00-06:00 | 8 | 8.9-14.2 | 80.1-99.1 | 166.28 |
| | 4 | 1967-1975 | 65-66 | 22:00-06:00 | 8 | 10.2-14.8 | 85.1-96.1 | 65.7 |
| | 5 | 1992-2000 | 66-67 | 23:00-06:00 | 8 | 10.3-13.7 | 85.2-99.7 | 97.02 |
| Promedio | | | | | 8.6 | 10.5C-14.6a | 84.1a-97.6ab | 137.246 |
| IV | 1 | 2137-2146 | 73 | 00:00-09:00 | 9 | 13-15.1 | 97.1-100 | 31.63 |
| | 2 | 2157-2169 | 73-74 | 20:00-07:00 | 11 | 12.7-15.6 | 80.8-100 | 0 |
| | 3 | 2181-2191 | 74-75 | 20:00-06:00 | 10 | 12.5-13.3 | 99.6-100 | 60.76 |
| | 4 | 2204-2216 | 75-76 | 19:00-07:00 | 12 | 10.8-16.2 | 81.8-99.7 | 6.9 |
| | 5 | 2228-2241 | 76-77 | 19:00-08:00 | 13 | 12.2-16 | 89.5-99.4 | 575.75 |
| | 6 | 2254-2265 | 77-78 | 21:00-08:00 | 11 | 12.9-14.7 | 88.4-96.7 | 16.3 |
| | 7 | 2277-2290 | 78-79 | 20:00-09:00 | 13 | 12.9-14.5 | 99.1-100 | 134.21 |
| | 8 | 2301-2313 | 79-80 | 20:00-08:00 | 12 | 12.7-17 | 81.2-93.6 | 0 |
| | 9 | 2325-2337 | 80-81 | 20:00-08:00 | 12 | 12.8-15.9 | 87.3-100 | 0 |
| | 10 | 2349-2362 | 81-82 | 20:00-09:00 | 13 | 11.6-13.9 | 99.4-100 | 32.37 |
| Promedio | | | | | 12.2 | 12.4b-15.2a | 90.4a-98.9a | 36.57 |
| V | 1 | 2545-2551 | 90 | 00:00-06:00 | 6 | 9.9-14.9 | 81.1-98.3 | 66.48 |
| | 2 | 2567-2576 | 90-91 | 22:00-07:00 | 9 | 10.9-13.9 | 82.7-93.1 | 45.02 |
| | 3 | 2589-2600 | 91-92 | 20:00-07:00 | 11 | 11.5-15.7 | 86.1-99.3 | 30.8 |
| | 4 | 2613-2625 | 92-93 | 20:00-08:00 | 12 | 10.3-17.4 | 85.2-100 | 441.03 |
| Promedio | | | | | 10.5 | 10.6c-15.4a | 83.7a-97.6ab | 123.98 |

* Los promedios con letras similares no son significativamente diferentes (prueba t de relación K de Waller-Duncan, $p < 0.05$) ♦ * Averages with similar letters are not significantly different (Waller-Duncan t test for relation K, $p < 0.05$).

^y No. 0.5 h = número de segmentos de 30 min acumulados, del 1 de junio al 18 de septiembre (104 días) de cada año ♦ No. 0.5 h = number of 30-minute segments, accumulated between June 1 and September 18 (104 days) of each year.

^z H_h horas acumuladas para RH > 80%, temperatura mínima y máxima T (°C), humedad relativa mínima y máxima HR (%), RS Radiación solar acumulada (Wm⁻²) ♦ ^z H_h hours accumulated for RH > 80%, highest and lowest temperatures T (°C), maximum and minimum relative humidity RH (%), SR Solar radiation accumulated (Wm⁻²).

diciones de ese año (Figura 2). Las condiciones climáticas fueron favorables para la infección de hojas en líneas susceptibles. A los 90-91 días después del trasplante (ddt), las plantas de las líneas susceptibles fueron 73% infectadas durante 2017.

to expected scenario IV-4. In general, during both planting cycles (2017 and 2018), the progress of the infection by *P. infestans* was favored by scenarios with T of 10-16.7 °C and an RH 80-100% for 8-13 h at night, dawn and part of the morning (19:00-

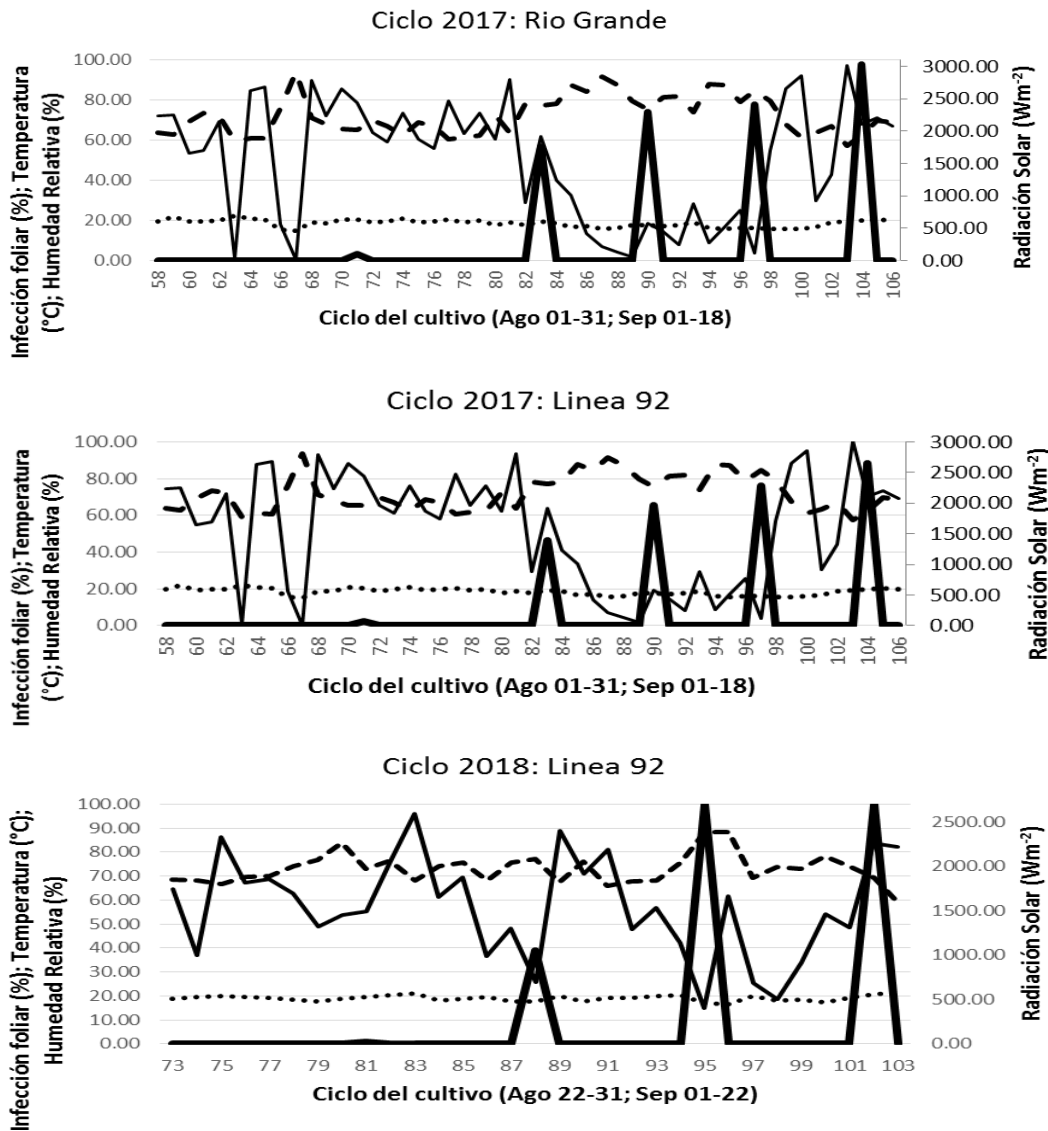


Figura 2. Progreso de la infección por *P. infestans* en una línea de jitomate susceptible durante dos temporadas de campo (2017, 2018) y una tolerante (2017) bajo las condiciones climáticas de Chapingo. (.....Temperatura (°C), - -Humedad relativa (%), —Radiación solar (Wm⁻²), — *P. infestans*).

Figure 2. Progress of the infection by *P. infestans* on a line of susceptible tomato during two seasons (2017, 2018) and one tolerant line (2017) under the weather conditions in Chapingo. (.....Temperatura (°C), - -Relative humidity (%), —Solar radiation (Wm⁻²), — *P. infestans*).

Un retraso similar en las tasas de infección también fue informado por Cadena-Hinojosa *et al.* (2007).

El progreso de la infección en la Línea 92 (plantas muertas en 100–104 ddt demostró la presencia de condiciones ambientales favorables para la propagación del patógeno, con temperatura de 10.6–15.4 °C, HR entre 83–98% durante 12 h, durante la noche, madrugada y parte de la mañana (20:00 a 08.00 h) coincidiendo con el escenario VI-4 esperado. Sin embargo, en 2018, la infección inició y progresó más tarde (en aproximadamente 79–81 ddt) en comparación a 2017, con 12–16.2 °C, 90–99% HR, que coincide con el escenario 6, 7, 8 (Cuadro 3).

En 2018, las plantas no presentan infección a los 95–96 ddt, 10–14.6 °C, y 100% HR durante 12 h en la noche, madrugada y al amanecer (20:00–08:00 h) siendo similar al escenario esperado IV-4.

08:00 h) (Andrade-Piedra, *et al.*, 2005c; Iglesias *et al.*, 2010). The average of 60-minute registers during the 102- to 104-day planting cycles in 2017 and 2018, displayed no significant differences between magnitudes of T (14.6 °C vs 15.4 °C) and RH (80% vs 83%). However, favorable conditions for the natural progression of the disease were observed and expected (based on the scenarios modelled). In 2017, the observed beginning of the infection coincided with scenarios I-2; in 2018, it coincided with scenarios II-3 and IV-5. In 2017, the point observed in which plants present no infection coincides with scenario IV-6, and in 2018, with scenario II-1 (Table 3).

The AUDPC, RAUDPC and RaRAUDPC were evaluated in a randomized experimental design with four blocks during 2017 and 2018. The results validated the proposed model, which was

Cuadro 3. Progreso de los niveles de infección por *P. infestans* en los escenarios observados y esperados en jitomate Línea 92, bajo las condiciones ambientales de Chapingo, México.

Table 3. Progress of levels on infection by *P. infestans* in the observed and expected scenarios in Line 92 tomato, under the weather conditions observed in Chapingo, Mexico.

| Ciclo del cultivo ^x | DAT _{t1} ^y | Horario | Variables meteorológicas ^z | | | Infección (%) | Escenario Esperado |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------|---------------------------------------|-----------|-----------|---------------|--------------------|
| | | | h | T | HR | | |
| 2017 I | 70-71 | 19:00-07:00 | 12 | 9.8-17 | 84.4-100 | 3.1 | I-2 |
| 2017 M1 | 82-83 | 19:00-08:00 | 13 | 12.2-16 | 87.2-100 | 56.6 | IV-4, IV-5 |
| 2017 M2 | 89-90 | 19:00-08:00 | 13 | 11.8-16 | 83.8-99.2 | 73.8 | |
| 2017 M3 | 96-97 | 19:00-08:00 | 13 | 12.1-15 | 83.3-100 | 77.5 | |
| 2017 F | 103-104 | 21:00-08:00 | 11 | 11.5-16.7 | 83-99.3 | 97.5 | IV-6 |
| 2018 I | 80-81 | 19:00-08:00 | 13 | 12-16.2 | 82.8-98.7 | 0.9 | II-3, IV-5 |
| 2018 MI | 87-88 | 19:00-08:00 | 13 | 11.9-15.8 | 83-100 | 39.1 | II-2 |
| 2018 F | 94-95 | 19:00-08:00 | 13 | 10-14.6 | 98.9-100 | 100 | II-1 |

^x I Fase temprana de la infección, M fase intermedia de la infección, F Fase final de la infección, 2017 I= 14 agosto 2017; 2017 M1= 25 al 26 agosto; 2017 M2= 1 al 2 septiembre; 2017 M3= 08-09 septiembre; 2017 F= 15 al 16 septiembre; 2018 i= 29 al 30 agosto; 2018 M= 05 al 06 septiembre; 2018 F= 12 al 13 septiembre ♦

^x I Early infection phase, M intermediate infection phase, F Final infection phase, 2017 I= 14 August 2017; 2017 M1= August 25 to 26; 2017 M2= September 1 to 2; 2017 M3= September 08-09; 2017 F= September 15 to 16; 2018 i= August 29 to 30; 2018 M= September 05 to 06; 2018 F= September 12 to 13.

^y DAT_{t1} = primera evaluación cuando se observaron lesiones causadas por *P. infestans* (número de días después del trasplante) ♦ ^y DAT_{t1} = first evaluation when lesions caused by *P. infestans* were observed (number of days after emergence).

^z H_h rango diario de horas con RH≥80%, rango de temperatura diaria de T (°C), rango de humedad relativa diaria de HR (%) ♦ ^z H_h daily range of hours with RH≥80%, daily temperature range for T (°C), range of relative humidity for RH (%).

En general, durante los dos ciclos de cultivo (2017 y 2018), el progreso de la infección por *P. infestans* fue favorecido por escenarios con T de 10-16.7 °C y HR 80-100% durante 8-13 h en la noche, madrugada y parte de la mañana (19:00-08:00 h) (Andrade-Piedra, *et al.*, 2005c; Iglesias *et al.*, 2010). El promedio de registros de 60 minutos durante el ciclo de cultivo de 102-104 días en 2017 y 2018, no mostraron diferencias significativas entre magnitudes de T (14.6 °C vs 15.4 °C) y HR (80% vs 83%). Sin embargo, condiciones favorables para la progresión natural de la enfermedad fueron observados y esperados (basado en los escenarios modelados). En 2017, el inicio observado de la infección coincidió con los escenarios I-2; en 2018, coincidió con los escenarios II-3 y IV-5. En 2017, el punto observado donde las plantas no presentan infección coincide con el escenario IV-6, y en 2018 con el escenario II-1 (Cuadro 3).

El AUDPC, RAUDPC y RaRAUDPC fueron evaluados en un diseño experimental aleatorizado con cuatro bloques durante 2017 y 2018. Los resultados validaron el modelo propuesto, siendo este confirmado por el desempeño homogéneo de la varianza a través de un análisis de residuos y la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, (SAS, 2002) (Cuadros 4 y 5).

En 2017, la estadística de las pruebas produjo el valor de 0.45 para AUDPC, RAUDPC y RaRAUDPC con $Pr < W 0.0001$ y en 2018, los tres valores fueron de 0.94. La normalidad de Shapiro-Wilk valida el modelo propuesto con un rendimiento homogéneo de varianza durante las dos temporadas de campo. AUDPC, RAUDPC, y RaRAUDPC fueron analizados individualmente sin encontrar diferencias entre tratamientos con $P < 0.0001$. Durante cada ciclo de cultivo, el efecto de orden de mérito AUDPC, RAUDPC, y RaRAUDPC fue mayor en las líneas susceptibles (línea 92) en comparación con tolerantes (Río grande). El t-test (LSD) y

confirmed by the homogenous performance of the variance through an analysis of residues and the Shapiro-Wilk normality test, (SAS, 2002) (Tables 4 and 5).

In 2017, the statistics of the tests produced the value of 0.45 for AUDPC, RAUDPC and RaRAUDPC with $Pr < W 0.0001$ and in 2018 the tree values were of 0.94. The Shapiro-Wilk normality validates the proposed model with a homogenous variance yield during both seasons. AUDPC, RAUDPC and RaRAUDPC were analyzed individually, although no differences were found between treatments with $P < 0.0001$. During each planting cycle, the effect of the order of merit AUDPC, RAUDPC, and RaRAUDPC was greater in susceptible lines (line 92) in comparison with tolerant lines (Río grande). The t-test (LSD) and Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) Test for the variable AUDPC and its derivatives indicate that all possible comparisons between tolerant and susceptible lines were important in 2017.

RaRAUDPC was used to generate a susceptibility scale (1-8) for the degree of resistance or susceptibility of lines in two planting cycles (Yuen and Forbes, 2009). This scale system is practical and easy to use, since it allows the minimum difference between observed averages of 7.6 vs 7.7 in the 2017 and 2018 cycles, respectively. This value becomes the maximum value (≤ 8) for susceptible and intermediate lines and the minimum value (< 1) for the resistant cultivar (Tables 4 and 5). The minimum value was not observed in the two planting cycles, due to their being no statistical differences in the RaRAUDPC of the lines due to their high AUDPC value.

Simulated scenario. The model "LATEBLIGHT" involved the use of specific procedures, including magnitudes of parameters and epidemiological

Cuadro 4. Valores medios de AUDPC, RAUDPC, y RaRAUDPC de las líneas de jitomate evaluadas en el campo temporada 2017 en Chapingo, México.**Table 4.** Mean values for AUDPC, RAUDPC, and RaRAUDPC in the tomato lines evaluated in the field, 2017 season in Chapingo, Mexico.

| Línea | AUDPC | Dev St | RAUDPC | Dev St | RaRAUDPC | Std. Dev. |
|-----------------|---------|--------|--------|--------|----------|-----------|
| Río grande (RG) | 1752.9a | 156.7 | 0.53a | 0.05 | 7.1a | 0.64 |
| Línea 3 | 1819.3a | 106.6 | 0.55a | 0.03 | 7.4a | 0.44 |
| Línea 51 | 1866.4a | 214.3 | 0.57a | 0.06 | 7.6a | 0.88 |
| Línea 72 | 1932.3a | 151.1 | 0.59a | 0.05 | 7.9a | 0.62 |
| Línea 92 | 1956.0a | 86.5 | 0.59a | 0.03 | 8.0a | 0.35 |
| Línea 43 | 1920.0a | 223.7 | 0.58a | 0.07 | 7.8a | 0.92 |
| Línea 77 | 1775.3 | 146.4 | 0.54a | 0.04 | 7.2a | 0.60 |
| Media | 1860.3 | | 0.56 | | 7.6 | |
| DSM | 372.4 | | 0.1 | | 1.5 | |
| CV | 8.7 | | 8.7 | | 8.7 | |
| R2 | 0.2 | | 0.2 | | 0.2 | |

* Los promedios con letras similares no son significativamente diferentes (Waller- Prueba t de relación K de Duncan, $p < 0,05$) DMS diferencia significativa mínima ♦ * Averages with similar letters are not significantly different promedios con letras similares no son significativamente diferentes (Waller-Prueba t de relación K de Duncan, $p < 0,05$) DMS diferencia significativa mínima.

Cuadro 5. Valores medios de AUDPC, RAUDPC, y RaRAUDPC de las líneas de jitomate evaluadas en el campo temporada 2018 en Chapingo, México.**Cuadro 5.** Mean values for AUDPC, RAUDPC, and RaRAUDPC of tomato lines evaluated in the field, season 2018 in Chapingo, Mexico.

| Línea | AUDPC | Dev St | RAUDPC | Dev St | RaRAUDPC | Std.Dev. |
|-----------------|---------|--------|--------|--------|----------|----------|
| Río grande (RG) | 1333.2a | 79.8 | 0.4a | 0.03 | 7.4a | 0.45 |
| Línea 3 | 1380.3a | 90.4 | 0.4a | 0.03 | 7.7a | 0.51 |
| Línea 51 | 1410.9a | 47.4 | 0.5a | 0.02 | 7.9a | 0.27 |
| Línea 72 | 1354.5a | 140.6 | 0.4a | 0.05 | 7.6a | 0.79 |
| Línea 92 | 1330.0a | 48.9 | 0.4a | 0.02 | 7.4a | 0.27 |
| Línea 43 | 1426.2a | 115.8 | 0.5a | 0.04 | 8.0a | 0.65 |
| Línea 77 | 1362.8a | 59.9 | 0.4a | 0.02 | 7.6a | 0.34 |
| Media | 1371.1 | | 0.4 | | 7.7 | |
| DSM | 205.6 | | 0.07 | | 1.1 | |
| CV | 6.5 | | 6.5 | | 6.5 | |
| R2 | 0.1 | | 0.1 | | 0.1 | |

* Los promedios con letras similares no son significativamente diferentes (Waller- Prueba t de relación K de Duncan, $p < 0,05$) DMS diferencia significativa mínima ♦ * Averages with similar letters are not significantly different (Waller-Duncan t test for relation K, $p < 0,05$) DMS minimum significant difference.

Tukey's Valores de Studentized Test (HDS) para la variable AUDPC y sus derivados indican que todas las posibles comparaciones entre líneas tolerantes y susceptibles fueron importantes en 2017.

variables (Table 6), weather parameters from the specific surroundings, and the estimation of the initial inoculant of the pathogen (Andrade-Piedra *et al.*, 2005c). These procedures helped obtain

RaRAUDPC se utilizó para generar una escala de susceptibilidad (1–8) del grado de resistencia o susceptibilidad de las líneas en dos ciclos de cultivo (Yuen y Forbes, 2009). Este sistema escalar es práctico y fácil de usar porque permite la mínima diferencia entre los promedios observados de 7.6 vs 7.7 en el ciclo 2017 y 2018, respectivamente. Este valor se convierte en el valor máximo (≤ 8) para las líneas susceptibles e intermedias y el valor mínimo (<1) para el cultivar resistente (Cuadros 4 y 5). El valor mínimo no se observó en los dos ciclos de cultivo debido a que no existieron diferencias estadísticas en RaRAUDPC de las líneas por su valor alto de AUDPC.

Escenario simulado. El modelo “LATEBLIGHT” involucró el uso de Procedimientos específicos, incluyendo magnitudes de parámetros y variables epidemiológicas (Cuadro 6), parámetros meteorológicos del entorno específico, y la estimación del inóculo inicial del patógeno (Andrade-Piedra *et al.*, 2005c). Estos procedimientos hicieron posible obtener valores de AUDPC observados y simulados, además de predecir epidemias en condiciones naturales de infección en Chapingo. En 2017, se utilizó el modelo para obtener valores de AUDPC simulado y observado para cada tratamiento (Figura 3). Además, el modelo predijo la incidencia de epidemias días antes del inicio de la infección natural en el campo, lo que permite la implementación de medidas de control integral. Por lo tanto, al predecir la epidemia, el modelo incluye magnitudes de variables y parámetros epidemiológicos (Cuadro 6) además de los parámetros meteorológicos de T entre 10.6 y 15.4 °C, HR entre 80 y 100% para períodos continuos de 9 a 13 h durante la noche, madrugada y mañana.

Sin embargo, la magnitud del umbral de humedad relativa no se mantuvo fijo en 85 o 90% en este modelo, debido a la variación causada por

Cuadro 6. Factores y niveles de condición de los parámetros utilizados para el modelo epidemiológico LATEBLIGHT para simular y predecir las epidemias de tizón tardío en Chapingo.

Table 6. Factors and levels of condition of the parameters used for the LATEBLIGHT epidemiological model to simulate and predict the late blight epidemics in Chapingo.

| Factor ^y | Nivel de condiciones para <i>Phytophthora infestans</i> ^z | | |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| | 0 | 0.5 | 1 |
| LP | 2.8 | 3.1 | 3.4 |
| LGR | 4.1 | 3.7 | 3.4 |
| SR | 2.9 | 2 | 1.2 |
| IE | 1 | 0.9 | 0.8 |
| IL | 500 | 50 | 5 |
| DOI | 1 | 11 | 21 |

^y LP Tiempo de latencia mínimo (días), LGR proporción máxima de desarrollo de la lesión ($m \text{ día}^{-1} \times 10^{-3}$), SR proporción máxima de esporulación (esporangio $m^{-2} \text{ día}^{-1} \times 10^8$), factor de eficiencia de infección IE (La proporción de esporangios y zoosporas que infectan al huésped con un máximo de 0,1 infecciones por esporangio por día y de 0,01 infecciones por zoosporas germinadas por día), la lesión inicial de IL (lesiones m^{-2} del suelo) no se aplica en condiciones de infección natural y el día de la inoculación DOI (días después de la emergencia) no se aplica en condiciones de infección natural ^z LP Minimum latency time (days), LGR maximum proportion of lesion development ($m \text{ día}^{-1} \times 10^{-3}$), SR maximum proportion of sporulation (sporangium $m^{-2} \text{ día}^{-1} \times 10^8$), infection efficiency factor IE (the proportion of sporangia and zoospores that infect the host with a maximum of 0,1 infections per sporangium every day and 0,01 infections per germinated zoospores every night), initial lesion of IL (lesions m^{-2} of the soil) does not apply under conditions of natural infection and the day of inoculation DOI (two days after emergence) does not apply under conditions of natural infection.

^z 0 = favorable (cultivar Tomasa susceptible); 0.5 = intermedio (cultivar intermedio Yungay); 1 = menos favorable (cultivar resistente Amarilis) Andrade-Piedra *et al.* 2005c ^z 0 = favorable (susceptible cultivar Tomasa); 0.5 = intermediate (intermediate cultivar Yungay); 1 = less favorable (resistant cultivar Amarilis) Andrade-Piedra *et al.* 2005c.

observed and simulated AUDPC values, as well as to predict epidemics under natural infection conditions in Chapingo. In 2017, the model was used to obtain simulated and observed AUDPC values for each treatment. In addition, the model predicted the incidence of epidemics days before

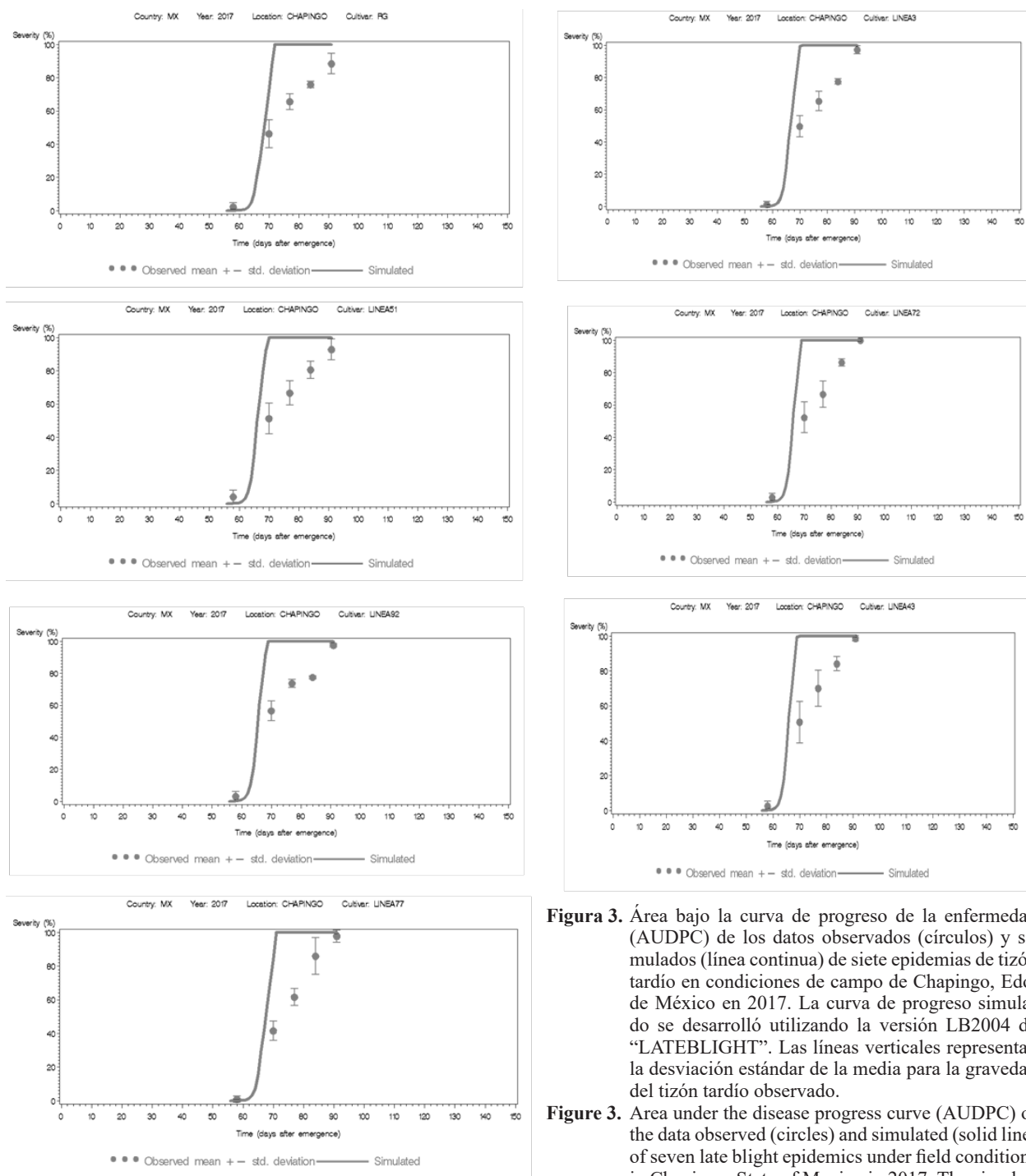


Figura 3. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) de los datos observados (círculos) y simulados (línea continua) de siete epidemias de tizón tardío en condiciones de campo de Chapingo, Edo. de México en 2017. La curva de progreso simulado se desarrolló utilizando la versión LB2004 de “LATEBLIGHT”. Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media para la gravedad del tizón tardío observado.

Figure 3. Area under the disease progress curve (AUDPC) of the data observed (circles) and simulated (solid line) of seven late blight epidemics under field conditions in Chapingo, State of Mexico in 2017. The simulated progress curve was developed using the LB2004 version of “LATEBLIGHT”. Vertical lines represent the standard deviation of the mean for the observed severity of late blight.

las condiciones ambientales de Chapingo. La HR requiere calibración dependiendo del grado de susceptibilidad de los cultivares; específicamente, al 80% para cultivares susceptibles, y al 88% para cultivares resistentes. El límite superior del 88% existe porque la humedad no supera el 90% dentro del dosel de la hoja (Andrade-Piedra *et al.*, 2005b). Las líneas susceptibles tienen valores de AUDPC > 1956 comparado a la línea tolerante (AUDPC < 1753) (Cuadro 7).

Durante el ciclo 2018, la aplicación del algoritmo del modelo generó valores de AUDPC simulados cercanos a los observados en el campo (Figura 4), el modelo predijo la incidencia de epidemias dos días antes de la infección natural observada en el campo. La predicción epidémica se desarrolló con las magnitudes de las variables y parámetros epidemiológicos (Cuadro 6), así como los parámetros meteorológicos de T entre 10.6 y 15.4 °C, HR

the natural infection in the field, which helps implement thorough control measures. Therefore, when predicting the outbreak, the model includes magnitudes of epidemiological variables and parameters (Table 6), as well as the weather parameters of T between 10.6 and 15.4 °C, RH between 80 and 100% for continuous periods of 9 to 13 h in the nighttime, dawn and morning.

However, the magnitude of the relative humidity threshold did not remain fixed on 85 or 90% in this model, due to the variation caused by the weather conditions in Chapingo. The RH requires calibration, depending on the degree of susceptibility of the cultivars; specifically, at 80% for susceptible cultivars, and 88% for resistant cultivars. The top limit of 88% exists because humidity does not surpass 90% inside the canopy (Andrade-Piedra *et al.*, 2005b) (Table 7). The susceptible lines have values for AUDPC > 1956

Cuadro 7. Parámetros y variables LATEBLIGHT para AUDPC en el ciclo de cosecha 2017.
Table 7. Parameters and LATEBLIGHT variables for AUDPC in plantation cycle 2017

| Línea ^w | AUDPC ^x | | LB2004 Variables ^y | | | | | Variables meteorológicas ^z | | | |
|--------------------|--------------------|------|-------------------------------|-----|-------|----|---------|---------------------------------------|-----|---------|----------|
| | Obs. | Sim. | HR | Mic | t0 | t1 | Eval0 | Horario | H_h | T | HR |
| Línea92 S | 1956.1 | 2559 | 80 | 209 | 50-51 | 58 | Ago. 06 | 19:00-04:00 | 9 | 10.1-17 | 84.4-100 |
| Línea72 I | 1932.3 | 2531 | 80 | 190 | 50-52 | 58 | Ago. 06 | 19:00-04:00 | 9 | 10.1-17 | 84.4-100 |
| Línea43 I | 1920 | 2523 | 80 | 160 | 50-53 | 58 | Ago. 06 | 19:00-04:00 | 9 | 10.1-17 | 84.4-100 |
| Línea51 I | 1866.4 | 2494 | 80 | 130 | 50-54 | 58 | Ago. 06 | 19:00-04:00 | 9 | 10.1-17 | 84.4-100 |
| Línea03 I | 1819.4 | 2446 | 80 | 98 | 50-55 | 58 | Ago. 06 | 19:00-04:00 | 9 | 10.1-17 | 84.4-100 |
| Línea77 I | 1775.3 | 2363 | 80 | 59 | 50-56 | 58 | Ago. 06 | 19:00-04:00 | 9 | 10.1-17 | 84.4-100 |
| RG R | 1753 | 2285 | 80 | 37 | 50-57 | 58 | Ago. 06 | 19:00-04:00 | 9 | 10.1-17 | 84.4-100 |

^w S susceptible, I intermedio, R resistente ♦ ^w S susceptible, I intermediate, R resistant.

^x obs = AUDPC observado; sim = AUDPC simulado ♦ ^x obs = AUDPC observed; sim = AUDPC simulated.

^y HR = RH_{threshold} = umbral de humedad relativa para estimar el período diario de humedad de la hoja (%); Mic = InMicCol = microcolonias iniciales utilizadas en la simulación, t0 = última evaluación de lesiones no observadas de *P. infestans* (días después de la emergencia) para estimar el inóculo inicial, t1 = primera evaluación de lesiones observadas de *P. infestans* (días después de la emergencia) para estimar el inóculo inicial; Eval0 = fecha de evaluación de la gravedad del patógeno sin lesiones observadas en el campo ♦ ^y RH = RH_{threshold} = relative humidity threshold to estimate the daily period of humidity of the leaf (%); Mic = InMicCol = initial microcolonies used in the simulation, t0 = last evaluation of unobserved lesions in *P. infestans* (days after emergence) to estimate the initial inoculum, t1 = first evaluation of lesions observed in *P. infestans* (days after emergence) to estimate the initial inoculum; Eval0 = date of evaluation of the severity of the pathogen without lesions observed in the field.

^z T Rango diario de la temperatura mínima del aire (°C), H_h período diario cuando la humedad relativa > 80%, calculado de 24:00 a 24:00, RH rango diario de humedad relativa ≥80% ♦ ^z T Daily range of the minimum air temperature (°C), H_h daily period when relative humidity > 80%, calculated de 24:00 to 24:00, RH daily range of relative humidity ≥80%.

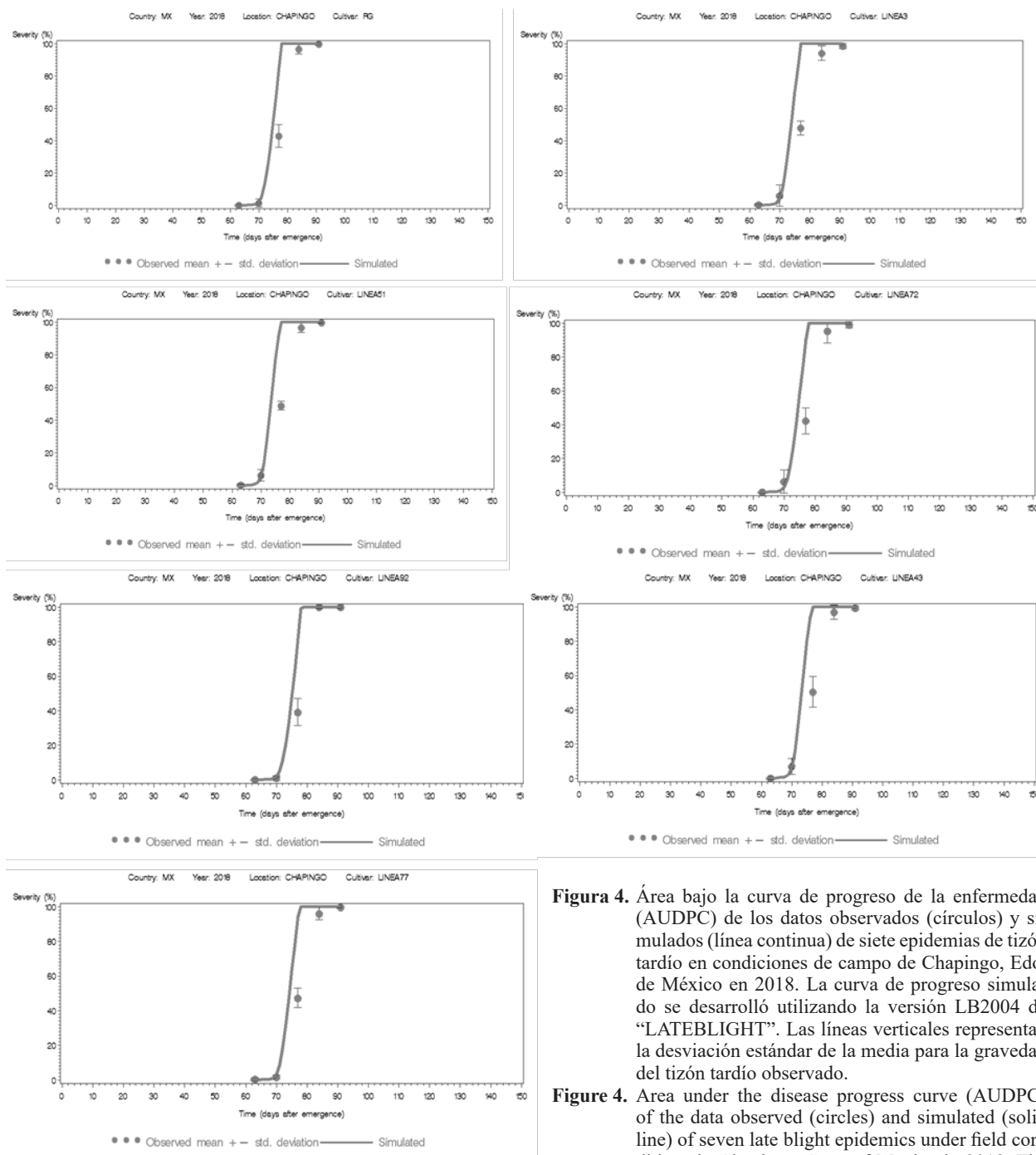


Figura 4. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) de los datos observados (círculos) y simulados (línea continua) de siete epidemias de tizón tardío en condiciones de campo de Chapingo, Edo. de México en 2018. La curva de progreso simulado se desarrolló utilizando la versión LB2004 de “LATEBLIGHT”. Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media para la gravedad del tizón tardío observado.

Figure 4. Area under the disease progress curve (AUDPC) of the data observed (circles) and simulated (solid line) of seven late blight epidemics under field conditions in Chapingo, State of Mexico in 2018. The simulated progress curve was developed using the LB2004 version of “LATEBLIGHT”. Vertical lines represent the standard deviation of the mean for the observed severity of late blight.

entre 80 y 100% para una longitud continua de 5 a 13.5 h en la noche y parte del amanecer. Sin embargo, la magnitud umbral de la humedad relativa no se mantuvo fija en 85 o 90%, según el modelo, por la variación causada por las condiciones ambientales en Chapingo. Como resultado, la HR se calibró a 80–85% para las líneas susceptibles y 86% para las líneas tolerantes. Este valor se utilizó porque la HR máxima no superaba el 90% de humedad dentro del dosel foliar (Andrade-Piedra *et al.*, 2005b). El AUDPC distingue a las líneas susceptibles (AUDPC > 1426) de las líneas tolerantes (AUDPC < 1333) (Cuadro 8).

Los escenarios esperados se basaron en (1) un mejor modelo de regresión lineal múltiple; (2) Un gráfico de tendencia, curvas; y (3) criterio de selección $80\% \leq RH \leq 90\%$ de T y RH. Estos criterios llevaron a la identificación de cinco escenarios favorables para epidemias de *P. infestans* con cuatro a

in comparison to the tolerant line (AUDPC < 1753) (Table 7).

During the 2018 cycle, the application of the model's algorithm generated simulated AUDPC values near to those observed in the field, and in turn, the model predicted the incidence of epidemics two days before the natural infection observed in the field. The epidemic prediction was developed with the magnitudes of the epidemiological variables and parameters (Table 6), as well as the weather parameters of T between 10.6 and 15.4 °C, an RH of between 80 and 100% for a continuous period of 5 to 13.5 h in the nighttime and part of the dawn. However, the threshold magnitude of relative humidity did not remain fixed on 85 to 90% according to the model, due to the variation caused by weather conditions in Chapingo. As a result, RH was calibrated to 80-85% for susceptible lines and 86% for tolerant lines. This value was used because

Cuadro 8. Parámetros y variables LATEBLIGHT para AUDPC en el ciclo de cosecha 2018.
Table 8. Parameters and LATEBLIGHT variables for AUDPC in harvest cycle 2018.

| Línea ^w | AUDPC ^x | | LB2004 Variables ^y | | | | Eval0 | Horario | Variables meteorológicas ^z | | |
|--------------------|--------------------|------|-------------------------------|-----|-------|----|---------|-------------|---------------------------------------|-----------|-----------|
| | Obs. | Sim | HR | Mic | t0 | t1 | | | H_h | T | HR |
| Línea 43 | 1426.2 | 1789 | 80 | 77 | 55-56 | 63 | Ago. 16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.8-15.4 | 82.1-96.3 |
| Línea 51 | 1410.9 | 1773 | 80 | 69 | 55-56 | 63 | Ago. 16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.8-15.4 | 82.1-96.3 |
| Línea 03 | 1380.3 | 1736 | 80 | 53 | 55-56 | 63 | Ago. 16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.8-15.4 | 82.1-96.3 |
| Línea 77 | 1362.8 | 1697 | 80 | 41 | 55-56 | 63 | Ago. 16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.8-15.4 | 82.1-96.3 |
| Línea 72 | 1354.5 | 1670 | 80 | 34 | 55-56 | 63 | Ago. 16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.8-15.4 | 82.1-96.3 |
| RG | 1333.2 | 1637 | 80 | 27 | 55-56 | 63 | Ago. 16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.8-15.4 | 82.1-96.3 |
| Línea 92 | 1330 | 1615 | 80 | 23 | 55-56 | 63 | Ago. 16 | 22:00-08:00 | 10 | 12.8-15.4 | 82.1-96.3 |

^w S susceptible, yo intermedio, R resistente ♦ ^w S susceptible, yo intermediate, R resistant.

^x Obs = AUDPC observado; sim = AUDPC simulado ♦ ^x Obs = AUDPC observed; sim = AUDPC simulated.

^y HR = RH_threshold = umbral de humedad relativa para estimar el período diario de humedad de la hoja (%); Mic = InMicCol = microcolonias iniciales utilizadas en la simulación, t0 = última evaluación de lesiones no observadas de *P. infestans* (días después de la emergencia) para estimar el inóculo inicial, t1 = primera evaluación de lesiones observadas de *P. infestans* (días después de la emergencia) para estimar el inóculo inicial; Eval0 = fecha de evaluación de la gravedad del patógeno sin lesiones observadas en el campo ♦ ^y RH = RH_threshold = relative humidity threshold to estimate the daily period of humidity of the leaf (%); Mic = InMicCol = initial microcolonies used in the simulation, t0 = last evaluation of unobserved lesions in *P. infestans* (days after emergence) to estimate the initial inoculum, t1 = first evaluation of lesions observed in *P. infestans* (days after emergence) to estimate the initial inoculum; Eval0 = date of evaluation of the severity of the pathogen without lesions observed in the field.

^z T Rango diario de la temperatura mínima del aire (°C), H_h período diario cuando la humedad relativa > 80%, calculado de 24:00 a 24:00, RH rango diario de humedad relativa ≥ 80% ♦ ^z T Daily range of the minimum air temperature (°C), H_h daily period when relative humidity > 80%, calculated de 24:00 to 24:00, RH daily range of relative humidity ≥ 80%.

diez ciclos de infección por *P. infestans* con una duración de 5 a 12 h para las condiciones ambientales en Chapingo. Las tasas de infección observadas durante los ciclos de cultivo 2017 y 2018 confirmaron que la incidencia real de condiciones favorables de *P. infestans* fue influenciado por condiciones ambientales (T y RH). Se encontró que la infección por *P. infestans* en el ciclo observado en campo en 2017 coincidió con los escenarios esperados IV-4 y III-1, y en el 2018 coincidió con el escenario V-2. El modelo del experimento de campo es válido con un coeficiente de variación de <16%.

CONCLUSIONES

El número de ciclos de infección del escenario esperado se relacionó de manera directa con la severidad que presentó *P. infestans* en los escenarios observados. Entre mayor es el número de ciclos de infección asociados con las condiciones ambientales favorables, mayor es la severidad de tizón tardío. Los escenarios simulados con el modelo LATEBLIGHT predijeron la severidad de los escenarios observados con dos días de antelación. De esta manera se obtuvo que entre los escenarios esperados, observados y simulados existe una estrecha relación para predecir epidemias de *P. infestans* en el cultivo de jitomate en Chapingo. En conclusión, el modelo demostró ser capaz de predecir epidemias de la infección en el campo, facilitando la aplicación oportuna de los métodos de control integral, lo que generaría beneficios económicos y reducir los impactos ambientales de agroquímicos.

LITERATURA CITADA

Alarcón-Rodríguez NM, Valadez-Moctezuma E and Lozoya-Saldaña H. 2014. Molecular Analysis of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary from Chapingo, Mexico.

the maximum RH did not surpass 90% within the foliar canopy (Andrade-Piedra *et al.*, 2005b) (Table 8). The AUDPC distinguishes susceptible lines (AUDPC > 1426) from tolerant lines (AUDPC < 1333) (Table 8).

The expected scenarios were based on (1) a better multiple linear regression model; (2) a tendency graph, curves; and (3) selection criterion $80\% \leq RH \leq 90\%$ for T and RH. These criteria helped identify five favorable scenarios for *P. infestans* epidemics with four to ten *P. infestans* infection cycles with a duration of 5 to 12 h for the weather conditions in Chapingo. The infection rates observed during the 2017 and 2018 planting cycles confirmed that the real incidence of conditions favorable to *P. infestans* was influenced by (1) weather conditions (T and RH). The infection caused by *P. infestans* in the cycle observed in the field in 2017 was observed to coincide with expected scenarios IV-4 and III-1, and in 2018, it coincided with scenario V-2. The field experiment model is valid with a coefficient variation of <16%.

CONCLUSIONS

The number of infection cycles in the expected scenario was directly related with the severity presented by *P. infestans* in the scenarios observed. The higher the number of infection cycles related to favorable weather conditions, the higher the severity of late blight will be. The scenarios simulated with the LATEBLIGHT model predicted the severity of the scenarios observed two days in advance. This led to expected, observed and simulated scenarios having a broad relation for the prediction of *P. infestans* epidemics in tomato crops in Chapingo. In conclusion, the model proved to be able to predict infection epidemics in the field, facilitating the timely application of the thorough

- Phylogeographic Referential. American journal of potato research 91:459-466. DOI 10.1007/s12230-014-9375-y
- Andrade-Piedra JL, Hijmans RJ, Forbes GA, Fry WE and Nelson RJ. 2005a. Simulation of potato late blight in the Andes I: Modification and parameterization of the LATEBLIGHT model. *Phytopathology* 95:1191–1199. DOI: 10.1094/PHYTO-95-1191
- Andrade-Piedra JL, Hijmans RJ, Juarez HS, Forbes GA, Shtienberg D and Fry WE. 2005b. Simulation of potato late blight in the Andes II: Validation of the LATEBLIGHT model. *Phytopathology* 95:1200–1208. DOI: 10.1094/PHYTO-95-1200
- Andrade-Piedra JL, Forbes GA, Shtienberg D, Grünwald NJ, Chacon MG, Yaipe MV, Hijmans RJ and Fry WE. 2005c. Qualification of a plant disease simulation model: Performance of the LATEBLIGHT model across a broad range of environments. *Phytopathology* 95:1412–1422. DOI: 10.1094/PHYTO-95-1412
- Berdúo-Sandoval JE, Ruiz-Chután JA and Sánchez-Pérez A. 2019. Evaluación de la resistencia de genotipos de tomate frente a aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud* 6:36-47. <https://digi.usac.edu.gt/ojsrevistas/index.php/cytes/article/view/672/562>
- Bonierbale MW, Haan SD, Forbes A and Bastos C. 2010. Procedimientos para pruebas de evaluación estandar de clones avanzados de papa: Guía para cooperadores internacionales. 151pp. <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/73221/73331.pdf?sequence=2>
- Bostock RM, Pye MF and Roubtsova TV. 2014. Predisposition in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual review of phytopathology* 52:517-549. DOI.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172902
- Cadena-Hinojosa MA, Diaz-Valasis M, Guzman-Plazola RA, Fernandez-Pavia S and Grunwald NJ. 2007. Late blight resistance of five mexican potato cultivars in the eastern sierra of the state of the Mexico. *American Journal of Potato Research* 84:385–392. <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=13571&content=PDF>
- Childers R, Danies G, Myers K, Fei Z, Small IM and Fry WE. 2015. Acquired Resistance to Mefenoxam in Sensitive Isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 105:342–349. dx.DOI.org/10.1094/PHYTO-05-14-0148-R
- Collinge DB, Jorgensen HJ, Lund OS and Lyngkjaer MF. 2010. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects. *Annu Rev Phytopathology* 48:269–291. DOI.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114430
- Danies G, Small IM, Myers K, Childers R and Fry WE. 2013. Phenotypic Characterization of Recent Clonal Lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Plant Disease* 97:873–881. dx.DOI.org/10.1094/PDIS-07-12-0682-RE
- Díaz CJB, Lozoya-Saldaña H, Sahagún-Castellanos J and Peña-Lomelí A. 2014. The Pathosystem *Solanum tuberosum* L.-*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo, Mexico. Expected, Observed, and Simulated. *American journal of potato research* 91:312-326. DOI 10.1007/s12230-013-9351-y
- control methods, which would produce economic benefits and reduce the environmental impacts of agrochemicals.
- ~~~~~ End of the English version ~~~~~
- Dudler R. 2013. Manipulation of host proteasomes as a virulence mechanism of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 51:521–42. DOI.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102312
- Forbes GA, Fry WE, Andrade-Piedra JL and Shtienberg D. 2008. Simulation models for potato late blight management and ecology. *Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria*. Pp: 161–177. Springer, Dordrecht.
- Fry WE. 1978. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of late blight. *Phytopathology* 68:1650–1655. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n11_1650.PDF
- García E. 1987. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen para adaptarlo a condiciones de México. Editorial de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Distrito Federal de México. 246 pp.
- Henfling JW. 1987. Late blight of potato: *Phytophthora infestans*. Technical information bulletin 4. International Potato Center, Lima, Peru. (Second edition, revised). 25 pp. <https://books.google.com.mx/books>
- Hu CH, Perez FG, Donahoo R, McLeod A, Myers K, Ivors K, Ristaino JB. 2012. Recent Genotypes of *Phytophthora infestans* in the Eastern United States Reveal Clonal Populations and Reappearance of Mefenoxam Sensitivity. *Plant Disease* 96:1323–1330. dx.DOI.org/10.1094/PDIS-03-11-0156-RE
- Iglesias I, Escudero O, Seijo C and Mendez J. 2010. *Phytophthora infestans* prediction for a potato crop. *American Journal of Potato Research* 87:32–40. DOI 10.1007/s12230-009-9114-y
- Johnson DA, Cummings TF, Ghanem RA and Alldredge JR. 2009. Association of solar irradiance and days of precipitation with incidence of potato late blight in the semiarid environment of the Columbia Basin. *Plant disease* 93:272–280. DOI:10.1094/PDIS-93-3-0272
- Johnson ACS, Jordan SA, Gevens AJ, Pathology P and Madison W. 2015. Efficacy of Organic and Conventional Fungicides and Impact of Application Timing on Control of Tomato Late Blight Caused by US-22, US-23 and US-24 Isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 99:641–647. DOI.org/10.1094/PDIS-04-14-0427-RE
- Kamoun S and Smart CD. 2005. Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Disease* 89:692–699. DOI: 10.1094/PD-89-0692
- Leyva-Mir SG, González-Solano CM, Rodríguez-Pérez JE and Montalvo-Hernández D. 2013. Behavior of advanced lines of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to phytopathogens at

- Chapingo, Mexico. Revista Chapingo. Serie Horticultura 19:301-313. DOI: 10.5154/r.rchsh.2012.12.070
- Morales W, Taïpe P and Forbes GA. 2011. Concentración e infección de esporangios de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en pre-emergencia de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*). <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/67656/74877.pdf?sequence=1>
- Nowicki M, Foolad MR, Nowakowska M and Kozik EU. 2012. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. Plant Disease 96:4-17. dx.DOI.org/10.1094/PDIS-05-11-0458
- Ojiambo PS, Gent DH, Quesada-Ocampo LM, Hausbeck MK and Holmes GJ. 2015. Epidemiology and Population Biology of *Pseudoperonospora cubensis*: A Model System for Management of Downy Mildews. Annual Review of Phytopathology 53:223-246. DOI.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120048
- SAS Institute Inc. Cary. 2002. SAS Online Doc® 9. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Saville A, Graham K, Grünwald NJ, Myers K, Fry WE and Ristaino JB. 2015. Fungicide Sensitivity of U.S. Genotypes of *Phytophthora infestans* to Six Oomycete-Targeted Compounds. Plant Disease 99:659-666. DOI.org/10.1094/PDIS-05-14-0452-RE
- Schornack S, Moscou MJ, Ward ER and Horvath DM. 2013. Engineering Plant Disease Resistance Based on TAL Effectors. Annual Review of Phytopathology 51:383-406. DOI.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102255
- Shaner G and Finney RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67:1051-1056.
- Skelsey P, Rossing WAH, Kessel GJT and Van der Werf W. 2009. Scenario approach for assessing the utility of dispersal information in decision support for aerially spread plant pathogens, applied to *Phytophthora infestans*. Phytopathology 99:887-895. DOI:10.1094/PHYTO-99-7-0887
- Skelsey P, Rossing WAH, Kessel GJT and Van der Werf W. 2010. Invasion of *Phytophthora infestans* at the landscape level: how do spatial scale and weather modulate the consequences of spatial heterogeneity in host resistance? Phytopathology 100:1146-1161. DOI.org/10.1094/PHYTO-06-09-0148
- Taïpe A, Forbes G and Andrade-Piedra J. 2011. Estimación del nivel de susceptibilidad a *Phytophthora infestans* en genotipos de papa. <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/67655/74876.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Yuen JE and Forbes GA. 2009. Estimating the level of susceptibility to *Phytophthora infestans* in potato genotypes. Phytopathology 99:782-786. DOI:10.1094/PHYTO-99-6-0782
- Yuen J and Mila A. 2015. Landscape-scale disease risk quantification and prediction. Annual Review of Phytopathology 53:471-484. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120406
- Zhan J and McDonald BA. 2013. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. Annual Review of Phytopathology 51:131-53. DOI.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102302.

Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds

Caracterización morfológica y genética de aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas

Santo Ángel Ortega-Acosta, ¹Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, Periférico Poniente s/n. CP 40020. Iguala de la Independencia, Guerrero, México; **Daniel Leobardo Ochoa-Martínez***, **Javier Hernández-Morales** Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, CP 56230, Texcoco, Estado de México, México; ¹**Francisco Palemón-Alberto**. *Autor para correspondencia: ldaniel@colpos.mx

Recibido: 27 de Septiembre, 2019.

Aceptado: 04 de Diciembre, 2019.

Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J and Palemón-Alberto F. 2020. Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 62-78.
DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1909-2

Primera publicación DOI: 10 de Diciembre, 2019.
First DOI publication: December 10, 2019.

Resumen. Se analizaron morfológica y filogenéticamente diferentes aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y nueve malezas asociadas al cultivo. Los aislados fúngicos se dividieron en dos grupos: el grupo uno incluyó 37 aislados obtenidos de *H. sabdariffa* y ocho obtenidos de otros hospedantes como *Solanum lycopersicum*, *Chromolaena odorata*, *Senna alata*, *Eugenia oerstediana*, *Passiflora viridiflora*, *Momordica charantia*, *Ricinus communis* y

Abstract. Several *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and nine associated weeds to this crop were morphological and phylogenetically analyzed. The fungal isolates were divided into two groups: group one included 37 isolates obtained from *H. sabdariffa* and eight obtained from other host plants including *Solanum lycopersicum*, *Chromolaena odorata*, *Senna alata*, *Eugenia oerstediana*, *Passiflora viridiflora*, *Momordica charantia*, *Ricinus communis* and *Gossypium hirsutum*; in this case, the predominant colonies were gray, dense texture and polygonal in shape. Group two included two isolates obtained from *H. sabdariffa* and one from *Hyptis suaveolens*; in this group the colonies were mainly cream and pale brown, dense and round. Comparative analysis with isolates of *C. cassiicola* from other countries showed that group one isolates were mainly associated with those isolated from the Solanaceae family, while those from group two were related to those of the

Gossypium hirsutum; en este caso, las colonias predominantes fueron de color gris, textura densa y forma poligonal. El grupo dos, incluyó a dos aislados obtenidos de *H. sabdariffa* y uno de *Hyptis suaveolens*; en este grupo, las colonias fueron principalmente de color crema y café pálido, densas y redondeadas. El análisis comparativo con aislados de *C. cassiicola* de otros países mostró que los aislados del grupo uno referidos anteriormente se asociaron principalmente con aquellos aislados de la familia Solanaceae, mientras que los del grupo dos se relacionaron con los de la familia Cucurbitaceae. Para nuestro conocimiento este es el primer estudio sobre la caracterización morfológica y genética de *C. cassiicola* en México.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, mancha foliar, análisis filogenético.

Corynespora cassiicola es un hongo fitopatógeno que causa manchas foliares en cultivos de importancia económica como calabacita (*Cucurbita pepo*), pepino (*Cucumis sativus*), soya (*Glycine max*), árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), papaya (*Carica papaya*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), entre otros (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.* 2011; Paz *et al.*, 2018). Además de hojas, este patógeno puede infectar otros órganos como tallos, raíces, flores y frutos (Deon *et al.*, 2014); se encuentra distribuido ampliamente en zonas tropicales y sub-tropicales de diversos países (Dixon *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

En México, el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es de gran valor económico con una superficie anual cultivada de 20,061 ha localizadas principalmente en el estado de Guerrero donde se produce más del 70% de cálices deshidratados (SIAP, 2016). En esta entidad, el manchado de hojas y cálices de la jamaica causado por *C. cassiicola*,

Cucurbitaceae family. To our knowledge, this is the first study on the morphological and genetic characterization of *C. cassiicola* in Mexico.

Key words: *Hibiscus sabdariffa*, leaf spot, phylogenetic analysis.

Corynespora cassiicola is a plant pathogenic fungus that causes foliar spots in economically important crops such as squash (*Cucurbita pepo*), cucumber (*Cucumis sativus*), soybean (*Glycine max*), rubber tree (*Hevea brasiliensis*), papaya (*Carica papaya*) and tomato (*Solanum lycopersicum*), among others (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.* 2011; Paz *et al.*, 2018). In addition to leaves, the pathogen infects other plant organs, including stems, roots, flowers and fruits (Deon *et al.*, 2014); it is widely distributed in tropical and subtropical regions of many countries (Dixon *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

In Mexico, roselle (*Hibiscus sabdariffa*) is a crop of great economic value with an annual area sown of 20,061 ha, mainly in the state of Guerrero, where over than 70% of dehydrated calyxes are produced (SIAP, 2016). In this state, roselle leaf and calix spots caused by *C. cassiicola* have become the most important crop disease in the last years (Ortega *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2018).

The genetic characterization of *C. cassiicola* has been evaluated using different techniques, including RAPD, ISSR, AFLP, iPBS and phylogeny (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011; Deon *et al.*, 2014; Oktavia *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). In the case of phylogeny, partial regions of the β -tubulin gene, 1- α elongation factor (EF-1 α), calmodulin and actin have been amplified, as well as internal transcribed spacers (Shimomoto *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017). The analysis of variability of the fungus has been used in ecological

se ha convertido en la enfermedad más importante del cultivo durante los últimos años (Ortega *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2018).

La caracterización genética de *C. cassiicola* se ha estudiado con técnicas como RAPDs, ISSR, AFLP, iPBS y filogenia (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011; Deon *et al.*, 2014; Oktavia *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). En este último caso, se han amplificado regiones parciales de los genes β -tubulina, factor de elongación 1- α (EF-1 α), calmodulina y actina, además de los espaciadores transcritos internos (Shimomoto *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017). El análisis de la variabilidad de este hongo se ha utilizado en estudios ecológicos, epidemiológicos, así como para el desarrollo de estrategias de manejo (Qi *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017; Sumabat *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). En México no hay trabajos relacionados con la caracterización de este hongo, por lo que la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar morfológica y genéticamente aislados de *C. cassiicola* obtenidos de hojas y cálices de jamaica y malezas asociadas al cultivo en el estado de Guerrero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de hongos. Durante el período de 2013 a 2015, se recolectaron cálices y hojas de jamaica así como hojas de malezas asociadas al cultivo con síntomas de lesiones necróticas en diferentes localidades del estado de Guerrero. En laboratorio se sembraron secciones de tejido foliar de la zona de avance de las lesiones (previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%) en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Las colonias obtenidas se purificaron mediante la técnica de cultivo monospórico.

and epidemiological studies and for developing management strategies (Qi *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017; Sumabat *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Since there are no studies about the characterization of this fungus in Mexico, the objective of this study was to characterize morphological and genetically several *C. cassiicola* isolates obtained from roselle leaves and calyxes, as well as weeds associated with the crop in the state of Guerrero.

MATERIALS AND METHODS

Fungi isolation. From 2013 to 2015, roselle leaves and calyxes, as well as leaves of weeds associated with the crop showing necrotic lesions, were collected in different sites of the state of Guerrero. Foliar tissue sections were taken from the area in which the lesion was growing, disinfested with 1% sodium hypochlorite and cultured on Petri dishes containing a potato-dextrose-agar (PDA) medium. The obtained colonies were purified using the monosporic culture technique.

Morphology and growth rate of colonies. Using 5-day-old monosporic cultures, fragments of 0.5 cm in diameter were taken from the edge of the colonies (Qi *et al.*, 2011), placed at the center of new Petri dishes with PDA and incubated at 28 °C (three replications per isolate) (Onesirosan *et al.*, 1974). The diameter of the colonies was measured every 24 h for five days considering the average length of two right-angle diameters (Qi *et al.*, 2011). Based on these data, the growth rate was calculated using the following formula: Growth rate = (Df-Di)/(Tf-Ti), where: Df = Final diameter of growth; Di= Initial diameter of growth; Tf=Final time; Ti= Initial time.

Morfología y tasa de crecimiento de la colonia. A partir de cultivos monospóricos de 5 días de edad, se obtuvieron fragmentos del margen de las colonias de aproximadamente 0.5 cm de diámetro (Qi *et al.*, 2011), los cuales se sembraron en el centro de nuevas cajas Petri con PDA y se incubaron a 28 °C (tres repeticiones por aislado) (Onesirosan *et al.*, 1974). El diámetro de las colonias se midió cada 24 h durante cinco días considerando la longitud media de dos diámetros en ángulo recto (Qi *et al.*, 2011). Con estos datos se calculó la tasa de crecimiento con la siguiente fórmula: Velocidad de crecimiento = $(Df-Di)/(Tf-Ti)$, donde: Df= Diámetro final de crecimiento, Di= Diámetro inicial de crecimiento, Tf=Tiempo final y Ti= Tiempo inicial.

Morfología de conidios. Con una cámara AmScope® MU 1000 fijada a un microscopio óptico Eclipse Ci (Nikon®, Japón), se obtuvieron imágenes digitales de los conidios obtenidos de cada aislado monospórico de cinco días de edad. Se midieron 50 conidios (largo x ancho) y se registraron sus formas. Las mediciones se hicieron con una reglilla micrométrica con la cual se calibró el analizador de imágenes ImageTool® v3.0. (Hernández *et al.*, 2005). Los datos de tasa de crecimiento, tamaño y morfología de conidios se tabularon y sometieron a un análisis de varianza y separación de medias (Duncan, $\alpha=0.01$) en el programa SAS ver. 9.4.

Extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación. Se realizó con el protocolo descrito por Sambrook y Rusell (2001) a partir del micelio de colonias monospóricas de 12 días de edad mantenidas a 28 °C en cajas Petri con PDA. Se amplificó un segmento del gen EF-1 α con los iniciadores EF1-728F/EF1-986R (Carbone y Kohn, 1999). La mezcla de reacción de PCR consistió en 2 μ L de buffer de PCR 1X, 0.6 μ L de MgCl₂ 2.0 μ M, 0.2 μ L de dNTP's 0.2 mM, 0.6 μ L de cada uno de los ini-

Morphology of conidia. Digital images of conidia obtained from each 5-day-old monosporic isolate were taken using an AmScope® MU 1000 camera attached to an Eclipse Ci optical microscope (Nikon®, Japan). The length and width of 50 conidia were measured, and their forms registered. Measurements were taken using a micrometric ruler with which the ImageTool® v3.0 image analyzer was calibrated. (Hernández *et al.*, 2005). Data on conidia growth rate, size and morphology were tabulated and subjected to an analysis of variance and mean separation (Duncan, $\alpha=0.01$) using SAS 9.4 version software.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing. For this purpose, the protocol described by Sambrook and Rusell (2001) was followed, using mycelium from 12-day-old monosporic colonies that were kept at 28 °C on Petri dishes with PDA. A segment of the EF-1 α gene was amplified with EF1-728F/EF1-986R primers (Carbone and Kohn, 1999). The PCR reaction mixture was prepared with 2 μ L of IX PCR buffer, 0.6 μ L of MgCl₂ 2.0 μ M, 0.2 μ L of dNTP's 0.2 mM, 0.6 μ L of each primer (10 μ M), 0.1 μ L of Taq DNA polymerase 0.5 U (Promega®, USA) and 10 ng of DNA extracted from the fungus. The final mixture was adjusted by adding sterile ultra-pure water at a 10 μ L final volume and amplified in a thermocycler (Techne-TC-512®, USA), according to the program described by Shimomoto *et al.* (2011). The obtained amplicons were purified with Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, USA) and sequenced in both directions in Macrogen Inc®.

Phylogenetic analysis. The sequences obtained from each isolate were edited and aligned using the SeqMan Pro module of the DNASTAR LaserGene® program to generate a consensus sequence.

ciadores (10 µM), 0.1 µL de Taq DNApolimerasa 0.5 U (Promega®, EE.UU.) y 10 ng del DNA extraído del hongo. La mezcla final se ajustó con agua ultra-pura estéril a un volumen final de 10 µL, y se amplificó en un termociclador (Techno-TC-512®, EE.UU.) con el programa descrito por Shimomoto *et al.* (2011). Los amplicones obtenidos se purificaron con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, EE.UU.) y se secuenciaron en ambas direcciones en Macrogen Inc®.

Análisis filogenético. Las secuencias obtenidas de cada aislado se editaron y alinearon para obtener una secuencia consenso con el módulo SeqMan Pro del programa DNASTAR LaserGene®. El árbol filogenético se realizó con el método Neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) usando las distancias genéticas calculadas con el modelo de dos parámetros (Kimura, 1980) con el programa MEGA versión 7.0. Para la reconstrucción del árbol filogenético, se utilizó como organismo fuera de grupo la secuencia parcial disponible en el GenBank del gen EF-1α de *Corynespora smithii* (No. de acceso AB539437). Las secuencias obtenidas de los aislados de *C. cassiicola* en estudio se depositaron en el GenBank con los números de acceso MF000841-MF000888 y se compararon con otras secuencias disponibles para esta especie (AB539285, AB539271, AB539291, AB539301, AB539235, AB539260, KY082897, KY290565, KP735616, KP834309, KP834310, AB539270, AB539283 y AB539269).

RESULTADOS

En total se obtuvieron 48 aislados de *C. cassiicola*, 39 de plantas de jamaica y nueve de malezas asociadas a este cultivo, distribuidas en cuatro municipios y 15 localidades del estado de Guerrero (Cuadro 1).

The phylogenetic tree was built following the Neighbour-joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987), using the genetic distances that were calculated according to the two-parameter model (Kimura, 1980) with the MEGA version 7.0 program. To re-construct the phylogenetic tree, the partial sequence of the EF-1α gene of *Corynespora smithii* available in the GenBank (Access number AB539437) was used as an organism external to the group. The sequences obtained from *C. cassiicola* isolates in this study were deposited in the GenBank with access numbers MF000841-MF000888, and compared to other sequences available for this species (AB539285, AB539271, AB539291, AB539301, AB539235, AB539260, KY082897, KY290565, KP735616, KP834309, KP834310, AB539270, AB539283 and AB539269).

RESULTS

A total of 48 *C. cassiicola* isolates were obtained, 39 of roselle plants and 9 of weeds associated with the crop distributed in 4 municipalities and 15 sites across the state of Guerrero (Table 1).

Morphology and growth rate of the colonies.

The colonies grown in PDA had uniform growth, developed an abundant aerial mycelium, and their morphology showed variation among isolates (Figure 1). The front side of the colonies was white, gray or green in color, while the center was white, brown, light brown, gray or dark gray. The texture in the front side varied from thin to thick, and the growth form from round to polygonal (Table 2). The average grown rates and size of the colonies showed significant differences among isolates (Table 3). The CC33GRO isolate had the highest growth rate with 0.67 centimeter/day (cm/d), and the greatest average diameter (5.07 cm) compared to those of CC07GRO and CC36GRO isolates,

Cuadro 1. Aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de plantas de jamaica y malezas asociadas al cultivo en el estado de Guerrero, México.

Table 1. *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle plants and weeds associated with the crop in the state of Guerrero, Mexico.

| Municipio | Aislado | Hospedante | Familia | Tejido |
|----------------|---------|-------------------------------|----------------|--------|
| Tecoanapa | CC1GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC3GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC4GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC5GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC6GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC7GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC9GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC10GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC11GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC12GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC13GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC14GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC15GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC16GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC17GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC18GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC19GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC21GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CC22GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Ayutla | CC26GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC27GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC29GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Ayutla | CC30GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC32GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Ayutla | CC33GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC34GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC36GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC38GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | CC40GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| San Marcos | CC42GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Xochistlahuaca | CC43GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC44GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC45GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC46GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC47GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC48GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Tecoanapa | CC49GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Ayutla | CC50GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Cáliz |
| Ayutla | CC51GRO | <i>H. sabdariffa</i> | Malvaceae | Hoja |
| Ayutla | JIT | <i>Solanum lycopersicum</i> | Solanaceae | Hoja |
| Tecoanapa | M26 | <i>Chromolaena odorata</i> | Asteraceae | Hoja |
| Tecoanapa | GUG | <i>Senna alata</i> | Fabaceae | Hoja |
| Ayutla | CHI | <i>Hyptis suaveolens</i> | Lamiaceae | Hoja |
| Tecoanapa | CAP | <i>Eugenia oerstediana</i> | Myrtaceae | Hoja |
| Ayutla | PAS | <i>Passiflora viridiflora</i> | Passifloraceae | Hoja |
| Tecoanapa | MAT | <i>Momordica charantia</i> | Cucurbitaceae | Hoja |
| Tecoanapa | HGA | <i>Ricinus communis</i> | Euphorbeaceae | Hoja |
| Ayutla | ALG | <i>Gossypium hirsutum</i> | Malvaceae | Hoja |

Morfología y tasa de crecimiento de la colonia. Las colonias desarrolladas en PDA tuvieron crecimiento uniforme, abundante micelio aéreo y su morfología mostró variación entre los aislados (Figura 1). La coloración de la parte frontal de las colonias fue blanca, gris o verde y el centro de las mismas fue blanca, café, café claro, café oscuro, gris o gris oscuro. La textura observada desde la parte frontal fue de ligera a gruesa y la forma de crecimiento de las colonias fue de redonda a poligonal (Cuadro 2). Las tasas de crecimiento promedio y el tamaño de las colonias mostraron diferencias significativas entre los aislados (Cuadro 3). En el aislado CC33GRO se registró la mayor tasa de crecimiento con 0.67 centímetro/día (cm/d), así como el mayor diámetro promedio (5.07 cm) con respecto de los aislados CC07GRO y CC36GRO que tuvieron la menor tasa de crecimiento y diámetro promedio de colonia (Cuadro 3).

Morfología de conidios. Se observó un alto grado de diferencia morfológica de conidios entre los diferentes aislados analizados. Las formas de los conidios observados fueron: ovales, obclavadas y cilíndricas con contornos rectos o curvos (Cuadro 3, Figuras 2, 4 y 5). El tamaño promedio máximo y mínimo varió de 8.4-305.4 μm x 2.9-23.0 μm (largo x ancho, respectivamente); el número de pseudoseptos fue de 0 a 15. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre aislados (Cuadro 3). Predominaron las formas de conidios cilíndricas (73%) seguidas de las obclavadas (24.75%) y ovales (2.25%) (Figura 5). El aislado CC9GRO presentó el mayor tamaño promedio de conidio (111.68 μm), mientras que el promedio más ancho correspondió al aislado CC17 (8.38 μm). La menor longitud promedio se observó en los aislados CC21GRO y CC50GRO (28.31 μm y 28.39 μm , respectivamente) y los conidios menos anchos en promedio fueron los del aislado JIT (5.12 μm). El

which had the lowest growth rate and lowest average diameter of colony (Table 3).

Morphology of conidia. A significant level of morphological difference was observed in conidia of the different isolates that were analyzed. The observed forms of conidia were oval, obclavate and cylindrical with straight or curve contours (Table 3, Figures 2, 4 and 5). The maximum and minimum average size ranged from 8.4-305.4 μm x 2.9-23.0 μm (length x width, respectively); the number of pseudosepta was 0 to 15. Significant statistical differences among isolates (Table 3) were found. Conidia with cylindrical form prevailed (73%) followed by obclavate (24.75%) and oval conidia (2.25%) (Figure 5). The CC9GRO isolate had the greatest mean conidial size (111.68 μm), while the CC17 (8.38 μm) had the highest average width. The smallest average length was observed in CC21GRO and CC50GRO isolates (28.31 μm and 28.39 μm , respectively) and the JIT isolate had the conidia with the lowest average width (5.12 μm). The CAP isolate had the greatest average number of pseudosepta (5 pseudosepta), and PAS had the lowest average number of pseudosepta (0.62) (Table 3).

Phylogenetic analysis. The 48 *C. cassicola* isolates used in this study were divided into two groups: group 1 formed by 37 isolates obtained from roselle, and 8 isolates from weeds associated with the crop; group 2 formed by 2 isolates obtained from roselle and 1 from weed associated with the crop (Figure 3).

DISCUSSION

Among the different *C. cassicola* isolates that were analyzed, a significant level of differences

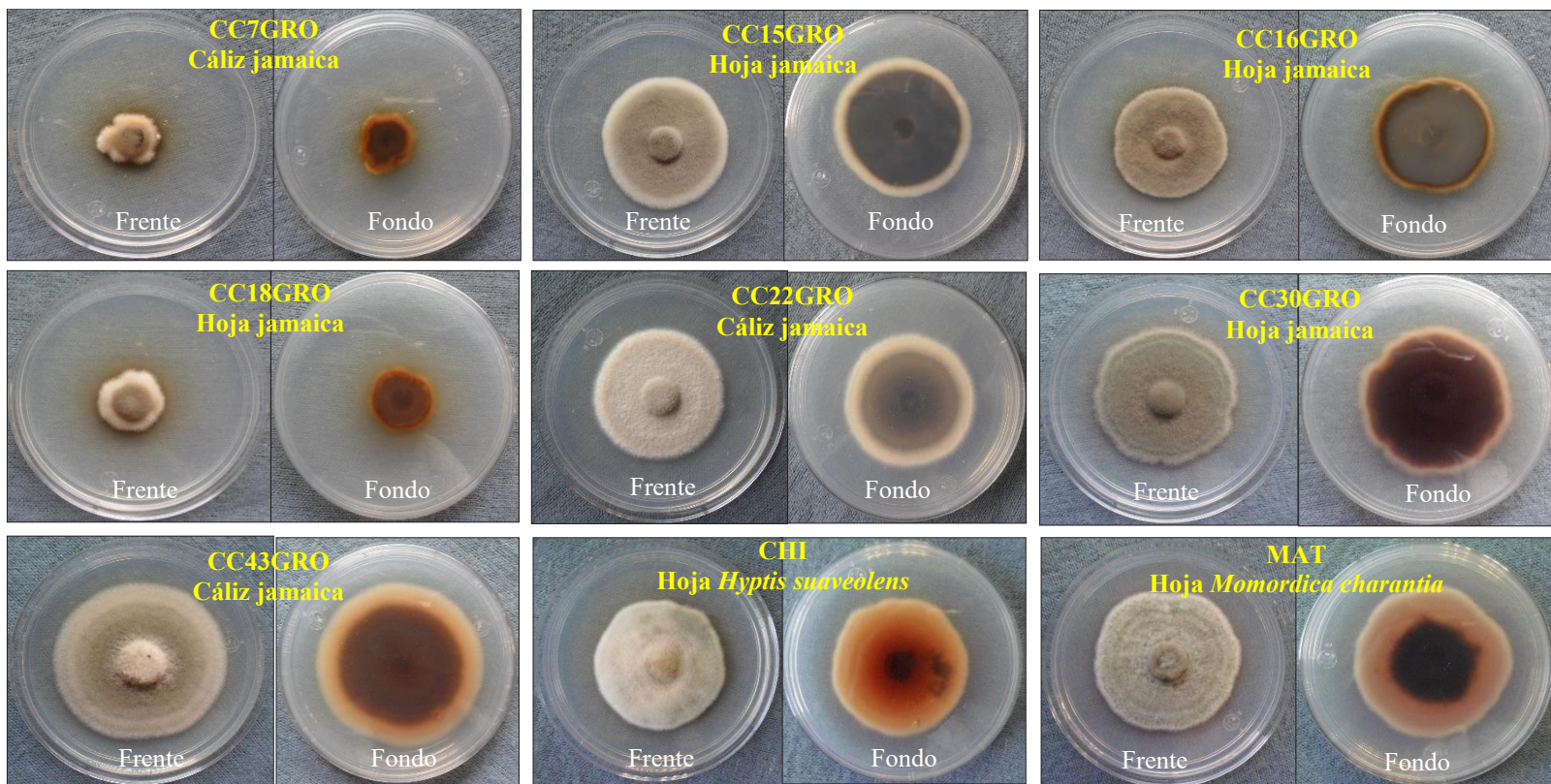


Figura 1. Diversidad morfológica de aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de plantas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y malezas asociadas al cultivo.
Figure 1. Morphological diversity of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle plants (*Hibiscus sabdariffa*) and weeds associated with the crop.

Cuadro 2. Color, textura, forma, tasa de crecimiento y tamaño de colonias de *Corynespora cassiicola* aislados de jamaica y malezas asociadas al cultivo después de cinco días de incubación.

Tabla 2. Color, texture, form, growth rate and size of colonies of *Corynespora cassiicola* isolated from roselle and weeds associated with the crop five days after incubation.

| Aislado | Color | | | | Tasa de crecimiento (cm/d) [†] | Tamaño (cm) [†] |
|---------|----------------|----------------|---------|----------|-----------------------------------------|------------------------------|
| | Parte Superior | Fondo | Textura | Forma | Promedio±SE | Promedio±SE |
| CC1GRO | Gris | Negro | Densa | Polígono | 0.40 ^{hijk} ±0.03 | 3.45 ^{hijkl} ±0.15 |
| CC3GRO | Café pálido | Gris claro | Densa | Redonda | 0.45 ^{cdefghij} ±0.06 | 3.93 ^{defghi} ±0.37 |
| CC4GRO | Gris | Café pálido | Ligera | Polígono | 0.34 ^{klm} ±0.01 | 3.38 ^{hijkl} ±0.03 |
| CC5GRO | Café pálido | Blanca | Densa | Redonda | 0.58 ^{abdef} ±0.03 | 4.68 ^{abcd} ±0.11 |
| CC6GRO | Gris | Gris oscuro | Ligera | Polígono | 0.43 ^{ghijk} ±0.03 | 3.60 ^{ghijk} ±0.13 |
| CC7GRO | Café claro | Café oscuro | Ligera | Polígono | 0.10 ^o ±0.02 | 1.88 ^{op} ±0.09 |
| CC9GRO | Gris | Café pálido | Densa | Polígono | 0.31 ^{iklm} ±0.02 | 2.90 ^{klm} ±0.06 |
| CC10GRO | Verde | Gris | Densa | Polígono | 0.31 ^{iklm} ±0.03 | 3.18 ^{ijkl} ±0.11 |
| CC11GRO | Gris | Gris | Ligera | Polígono | 0.34 ^{klm} ±0.01 | 3.10 ^{ijklm} ±0.05 |
| CC12GRO | Crema | Gris | Densa | Redonda | 0.52 ^{abdefgh} ±0.06 | 3.92 ^{efghi} ±0.26 |
| CC13GRO | Naranja ligero | Café pálido | Densa | Polígono | 0.22 ^{lmno} ±0.00 | 2.57 ^{mno} ±0.03 |
| CC14GRO | Gris | Gris | Ligera | Polígono | 0.29 ^{klmn} ±0.06 | 2.83 ^{lmn} ±0.19 |
| CC15GRO | Gris | Oscuro | Ligera | Redonda | 0.62 ^{ab} ±0.02 | 4.28 ^{bdefg} ±0.07 |
| CC16GRO | Crema | Gris | Ligera | Polígono | 0.44 ^{defghijk} ±0.02 | 3.70 ^{efghi} ±0.10 |
| CC17GRO | Gris | Gris | Ligera | Polígono | 0.29 ^{klmn} ±0.01 | 2.55 ^{mno} ±0.03 |
| CC18GRO | Gris | Café pálido | Ligera | Polígono | 0.19 ^{mno} ±0.01 | 2.15 ^{nop} ±0.05 |
| CC19GRO | Gris claro | Gris | Ligera | Redonda | 0.44 ^{defghijk} ±0.01 | 3.67 ^{efghi} ±0.04 |
| CC21GRO | Gris | Gris | Ligera | Redonda | 0.59 ^{abced} ±0.02 | 4.43 ^{abced} ±0.02 |
| CC22GRO | Crema | Gris | Densa | Redonda | 0.55 ^{abdefgh} ±0.01 | 4.43 ^{abced} ±0.01 |
| CC26GRO | Gris | Oscuro | Densa | Polígono | 0.23 ^{lmno} ±0.01 | 2.53 ^{mno} ±0.07 |
| CC27GRO | Gris | Café oscuro | Densa | Polígono | 0.22 ^{lmno} ±0.03 | 2.48 ^{mno} ±0.20 |
| CC29GRO | Verde | Negro | Densa | Polígono | 0.42 ^{ghijk} ±0.01 | 3.97 ^{defgh} ±0.02 |
| CC30GRO | Verde | Café oscuro | Densa | Polígono | 0.53 ^{abdefgh} ±0.02 | 4.33 ^{abcedf} ±0.09 |
| CC32GRO | Gris claro | Gris | Densa | Redonda | 0.57 ^{abdefg} ±0.04 | 4.43 ^{abced} ±0.15 |
| CC33GRO | Gris | Negro | Densa | Redonda | 0.67 ^a ±0.02 | 5.07 ^a ±0.04 |
| CC34GRO | Gris | Gris oscuro | Densa | Redonda | 0.54 ^{abdefgh} ±0.03 | 4.25 ^{bdefg} ±0.15 |
| CC36GRO | Gris | Café oscuro | Densa | Polígono | 0.13 ^o ±0.01 | 1.73 ^p ±0.06 |
| CC38GRO | Gris | Gris | Ligera | Polígono | 0.36 ^{ijkl} ±0.03 | 3.17 ^{ijklm} ±0.09 |
| CC40GRO | Naranja ligero | Café pálido | Densa | Polígono | 0.40 ^{hijk} ±0.05 | 3.57 ^{ghijkl} ±0.22 |
| CC42GRO | Gris | Gris | Ligera | Redonda | 0.59 ^{abcd} ±0.02 | 4.35 ^{abcedf} ±0.12 |
| CC43GRO | Crema | Naranja ligero | Densa | Redonda | 0.62 ^{ab} ±0.05 | 4.97 ^{ab} ±0.24 |
| CC44GRO | Crema | Café oscuro | Ligera | Polígono | 0.24 ^{lmn} ±0.01 | 2.88 ^{klm} ±0.03 |
| CC45GRO | Café pálido | Café claro | Ligera | Polígono | 0.15 ^{no} ±0.00 | 1.87 ^{op} ±0.02 |
| CC46GRO | Gris | Gris | Ligera | Redonda | 0.53 ^{abdefgh} ±0.04 | 3.95 ^{defgh} ±0.28 |
| CC47GRO | Crema | Gris Claro | Densa | Polígono | 0.50 ^{bdefghi} ±0.05 | 3.98 ^{defgh} ±0.22 |
| CC48GRO | Crema | Gris | Densa | Redondo | 0.42 ^{ghijk} ±0.05 | 3.78 ^{efghi} ±0.26 |
| CC49GRO | Gris | Crema | Densa | Redonda | 0.45 ^{cdefghij} ±0.07 | 3.85 ^{efghi} ±0.33 |
| CC50GRO | Crema | Crema | Densa | Redonda | 0.45 ^{defghijk} ±0.02 | 3.93 ^{defghi} ±0.10 |
| CC51GRO | Gris | Negro | Densa | Redonda | 0.46 ^{cdefghij} ±0.05 | 3.83 ^{efghi} ±0.22 |
| JIT | Gris | Crema | Ligera | Polígono | 0.42 ^{ghijk} ±0.02 | 3.57 ^{ghijkl} ±0.07 |
| M26 | Gris | Café pálido | Ligera | Polígono | 0.41 ^{ghijk} ±0.02 | 3.37 ^{hijkl} ±0.11 |
| GUG | Gris | Café pálido | Densa | Redonda | 0.65 ^{ab} ±0.01 | 4.83 ^{abc} ±0.17 |
| CHI | Gris | Café pálido | Densa | Redonda | 0.61 ^{abc} ±0.10 | 4.75 ^{abc} ±0.51 |
| CAP | Gris claro | Gris | Ligera | Redonda | 0.53 ^{abdefgh} ±0.05 | 4.10 ^{defgh} ±0.20 |
| PAS | Verde | Café pálido | Densa | Redonda | 0.53 ^{abdefgh} ±0.00 | 4.35 ^{abcedf} ±0.03 |
| MAT | Gris | Café pálido | Densa | Polígono | 0.55 ^{abdefgh} ±0.05 | 4.25 ^{bdefg} ±0.28 |
| HGA | Naranja ligero | Café pálido | Densa | Polígono | 0.32 ^{iklm} ±0.02 | 3.10 ^{ijklm} ±0.10 |
| ALG | Gris | Café claro | Densa | Polígono | 0.43 ^{efghijk} ±0.03 | 3.82 ^{efghi} ±0.11 |

[†]Los datos son el promedio de tres repeticiones. Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P=0.01) basados en test de rango múltiple de Duncan / [†]Data are the average of three replications. Means with the same letter in the same column are not significantly different (P=0.01) based on Duncan's multiple range test.

Cuadro 3. Tamaño de conidios y número de pseudoseptos de *Corynespora cassiicola* aislados de jamaica y malezas asociadas al cultivo (promedio de 50 conidios/aislado).**Table 3.** Conidia size and number of pseudosepta of *Corynespora cassiicola* isolates from roselle and weeds associated with the crop (average of 50 conidia/isolate).

| Aislado | Largo (um) | | | Ancho (um) | | | No. de pseudoseptos | | |
|---------|------------|--------|-------------------------|------------|-------|------------------------|---------------------|-----|------------------------|
| | Min | Max | Media [¶] ±ES | Min | Max | Media [¶] ±ES | Min | Max | Media [¶] ±ES |
| CC1GRO | 12.96 | 139.71 | 47.89 hijklmnop±0.3 | 2.97 | 9.62 | 6.40 hijklm ±0.2 | 0 | 5 | 1.92 fghijklmn±0.2 |
| CC3GRO | 19.71 | 151.91 | 75.74 cd±4.58 | 4.05 | 9.69 | 6.58 fghij ±0.17 | 0 | 7 | 2.74 cdefgh±0.25 |
| CC4GRO | 16.76 | 124.75 | 54.78 efghijklm±3.09 | 5.06 | 12.02 | 7.91 ab ±0.21 | 0 | 8 | 2.7 cdefghi±0.27 |
| CC5GRO | 17.59 | 142.27 | 53.28 fghijklm±3.79 | 4.05 | 9.08 | 6.4 hijklmn± 0.16 | 1 | 7 | 2.54 cdefghi±0.21 |
| CC6GRO | 11.65 | 126.39 | 40.19 lmnopq±3.41 | 4.11 | 9.1 | 5.70 mnop ±0.15 | 0 | 5 | 1.78 ghijklmn±0.19 |
| CC7GRO | 20.1 | 117.21 | 48.22 hijklmnop±3.24 | 4.52 | 8.86 | 6.34 hijklmn ±0.15 | 0 | 7 | 2.68 cdefghi±0.27 |
| CC9GRO | 23.27 | 283.74 | 111.68 a±9.84 | 5.11 | 11.13 | 7.72 ab±0.22 | 0 | 6 | 2.84 cdefg±0.25 |
| CC10GRO | 12.28 | 178.22 | 48.04 hijklmnop±5.0 | 4.57 | 9.33 | 6.23 hijklmnop±0.17 | 0 | 9 | 1.98 efghijklm±0.31 |
| CC11GRO | 15.11 | 99.77 | 44.91 ijklmnopq±3.73 | 4.33 | 8.79 | 7.21 bcdefg±0.17 | 0 | 8 | 2.63 cdefghi±0.29 |
| CC12GRO | 17.78 | 110.43 | 41.62 klmnopq±2.33 | 4.35 | 9.1 | 6.56 fghijk±0.19 | 0 | 8 | 1.38 jklmno±0.21 |
| CC13GRO | 14.92 | 112.78 | 39.77 lmnopq±2.57 | 4.39 | 7.38 | 5.93 jklmno±0.08 | 0 | 6 | 1.6 ijklmno±0.21 |
| CC14GRO | 24.53 | 177.77 | 82.81 bc±5.22 | 5.07 | 9.24 | 7.35 bcde±0.15 | 0 | 7 | 2.9 cdefg±0.27 |
| CC15GRO | 9.41 | 61.66 | 33.30 opq±1.45 | 4.23 | 9.05 | 6.19 hijklmnop±0.15 | 0 | 4 | 1.18 klmno±0.16 |
| CC16GRO | 9.83 | 263.4 | 66.64 cdefg±6.48 | 4.25 | 10.22 | 6.62 efghij±0.24 | 0 | 7 | 2.22 cdefghijk±0.23 |
| CC17GRO | 18.56 | 114.76 | 55.37 efghijkl±3.65 | 5.5 | 23.06 | 8.38 a±0.37 | 0 | 4 | 0.92 mno±0.15 |
| CC18GRO | 13.9 | 124.45 | 51.01 ghijklmnop±3.89 | 4.09 | 9.57 | 6.87 cdefgh±0.18 | 0 | 6 | 1.66 hijklmnop±0.21 |
| CC19GRO | 11.46 | 107.31 | 42.73 klmnopq±3.15 | 4.35 | 7.75 | 6.03 ijklmno±0.11 | 0 | 10 | 2.08 efghijk±0.28 |
| CC21GRO | 12.6 | 59.93 | 28.31 q ±1.44 | 4.27 | 8.34 | 6.03 ijklmno±0.13 | 0 | 4 | 0.88 no±0.14 |
| CC22GRO | 16.23 | 114.32 | 36.62 mnopq ±2.77 | 4.69 | 9.46 | 6.20 hijklmnop±0.14 | 0 | 4 | 1.16 klmno±0.17 |
| CC26GRO | 17.37 | 102.84 | 41.84 klmnopq±2.51 | 4.25 | 9.36 | 6.53 ghijk±0.15 | 0 | 7 | 1.98 efghijklm±0.21 |
| CC27GRO | 25.56 | 149.53 | 71.23 cde ±4.39 | 4.11 | 10.22 | 6.90 cdefgh±0.16 | 0 | 10 | 2.94 cdef±0.26 |
| CC29GRO | 14.38 | 76.14 | 34.56 nopq ±2.13 | 4.01 | 7.48 | 5.6 op±0.12 | 0 | 7 | 2.1 defghijk±0.21 |
| CC30GRO | 12.58 | 97.57 | 46.87 hijklmnop±3.09 | 4.12 | 8.75 | 5.91 jklmno±0.14 | 0 | 4 | 1.3 jklmno±0.17 |
| CC32GRO | 19.11 | 155.79 | 62.82 defghi ±4.67 | 4.5 | 9.95 | 6.6 fghij±0.17 | 0 | 6 | 3.08 cde±0.19 |
| CC33GRO | 27.42 | 99.99 | 61.32 defghij ±3.03 | 4.91 | 10.66 | 7.53 bc±0.17 | 0 | 9 | 4.44 a±0.33 |
| CC34GRO | 8.42 | 52.64 | 32.67 pq ±1.41 | 4.05 | 8.28 | 5.71 lmnop±0.11 | 0 | 4 | 1.58 ijklmno±0.12 |
| CC36GRO | 16.76 | 184.16 | 49.74 ghijklmnop ±4.66 | 4.05 | 9.33 | 6.55 fghijk±0.15 | 0 | 6 | 2.22 cdefghijk±0.23 |
| CC38GRO | 16.68 | 219.21 | 70.42 cdef ±6.11 | 5.34 | 9.85 | 7.45 bed±0.17 | 0 | 11 | 4.26 a±0.42 |
| CC40GRO | 19.74 | 135.73 | 59.57 defghijk ±3.43 | 4.93 | 10.22 | 7.19 bcdefg±0.18 | 0 | 7 | 2.7 cdefghi±0.26 |
| CC42GRO | 14.31 | 169.96 | 54.92 efghijklm ±4.45 | 5.17 | 9.77 | 7.43 bcd±0.15 | 0 | 8 | 2.66 cdefghi±0.27 |
| CC43GRO | 16.07 | 89.89 | 41.52 klmnopq ±2.29 | 4.63 | 8.94 | 6.51 ghijk±0.15 | 1 | 6 | 3.22 bcd±0.19 |
| CC44GRO | 16.16 | 125.75 | 63.05 defgh ±3.97 | 4.7 | 8.72 | 6.32 hijklmnop±0.13 | 1 | 13 | 4.12 ab±0.30 |
| CC45GRO | 18.57 | 149.9 | 48.94 ghijklmnop ± 3.75 | 5.5 | 8.1 | 6.79 cdefghi±0.1 | 1 | 9 | 3 cdef±0.23 |
| CC46GRO | 20.62 | 305.46 | 74.77 cd± 8.97 | 4.36 | 9.84 | 6.6 fghij±0.18 | 0 | 10 | 3.3 bc±0.29 |
| CC47GRO | 11.34 | 89.37 | 40.93 lmnopq± 2.3 | 4.53 | 8.79 | 6.45 ghijkl±0.17 | 0 | 6 | 2.3 cdefghij±0.13 |
| CC48GRO | 9.78 | 102.82 | 38.04 lmnopq ± 2.42 | 4.52 | 9.14 | 6.28 hijklmnop±0.14 | 0 | 8 | 2.04 efghijk±0.19 |
| CC49GRO | 24.32 | 105.06 | 51.26 ghijklmno ± 2.69 | 4.59 | 8.74 | 6.50 ghijk±0.14 | 0 | 6 | 2.02 efghijk±0.18 |
| CC50GRO | 11.35 | 60.92 | 28.38 q ±1.59 | 3.85 | 8.34 | 5.62 nop±0.14 | 0 | 3 | 1.06 lmno±0.12 |
| CC51GRO | 13.47 | 73.35 | 38.20 lmnopq ±2.17 | 4.3 | 10.03 | 6.91 cdefgh±0.17 | 0 | 4 | 1.92 fghijklmn±0.16 |
| JIT | 14.35 | 77.69 | 36.94 lmnopq ±2.16 | 4.04 | 6.46 | 5.12 p±0.09 | 0 | 8 | 2.1 defghijk±0.26 |
| M26 | 16.81 | 112.44 | 45.89 hijklmnopq ±2.57 | 4.66 | 8.02 | 6.52 ghijk±0.11 | 0 | 6 | 2.38 cdefghij±0.23 |
| GUG | 15.46 | 210.2 | 52.59 ghijklmn ±4.56 | 4.11 | 9.41 | 6.91 cdefgh±0.18 | 0 | 8 | 2.86 cdefg±0.27 |
| CHI | 21.53 | 60.38 | 38.25 lmnopq ±1.45 | 4.85 | 10.52 | 7.3.0 bcdef±0.18 | 0 | 5 | 2.2 cdefghijk±0.16 |
| CAP | 14.64 | 284.62 | 93.346 b ± 8.98 | 4.49 | 9.69 | 7.40 bcd±0.17 | 0 | 15 | 5 a±0.57 |
| PAS | 11.17 | 126.13 | 51.52 ghijklmno ±3.75 | 4.44 | 8.57 | 6.34 hijklmn±0.15 | 0 | 3 | 0.62 o±0.12 |
| MAT | 19.22 | 97.07 | 43.61 jklmnopq ±2.60 | 4.41 | 9.09 | 6.74 defghi±0.16 | 0 | 5 | 2.36 cdefghij±0.18 |
| HGA | 11.74 | 122.29 | 42.85 klmnopq± 2.85 | 4.34 | 9.95 | 6.44 ghijkl±0.14 | 0 | 9 | 2.1 defghijk±0.25 |
| ALG | 17.06 | 93.07 | 52.78 ghijklmn ±2.79 | 4 | 8.39 | 5.81 klmnop±0.17 | 0 | 8 | 2.58 cdefghi±0.27 |

[¶]Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P=0.01) basados en test de rango múltiple de Duncan. /

[¶]Means with the same letter in the same column are not significantly different (P=0.01) based on Duncan's multiple range test.

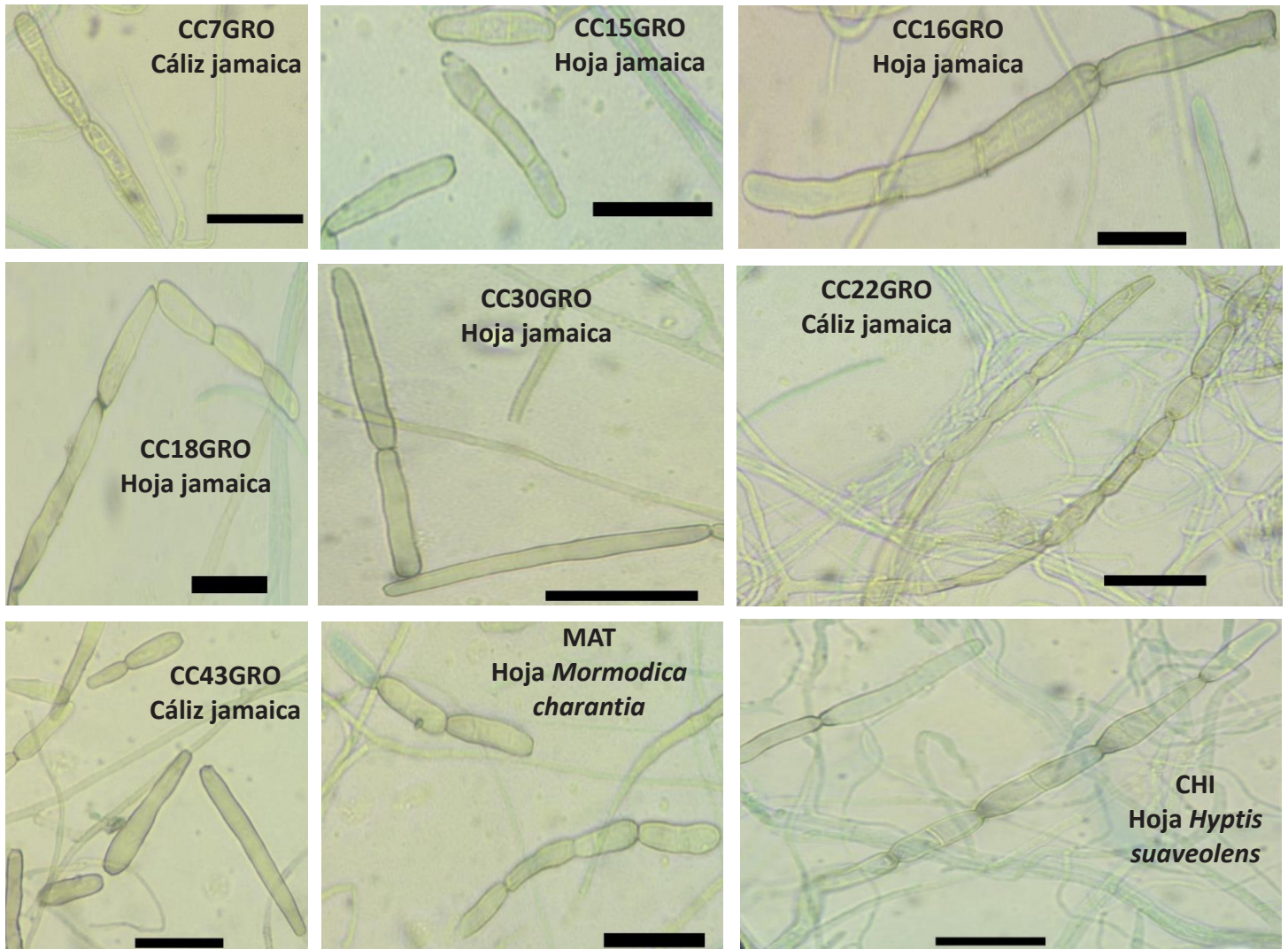


Figura 2. Diversidad morfológica de conidios de aislados de *C. cassicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo. Barra=30 μ m.
Figure 2. Morphological diversity of conidia of *C. cassicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop. Bars=30 μ m.

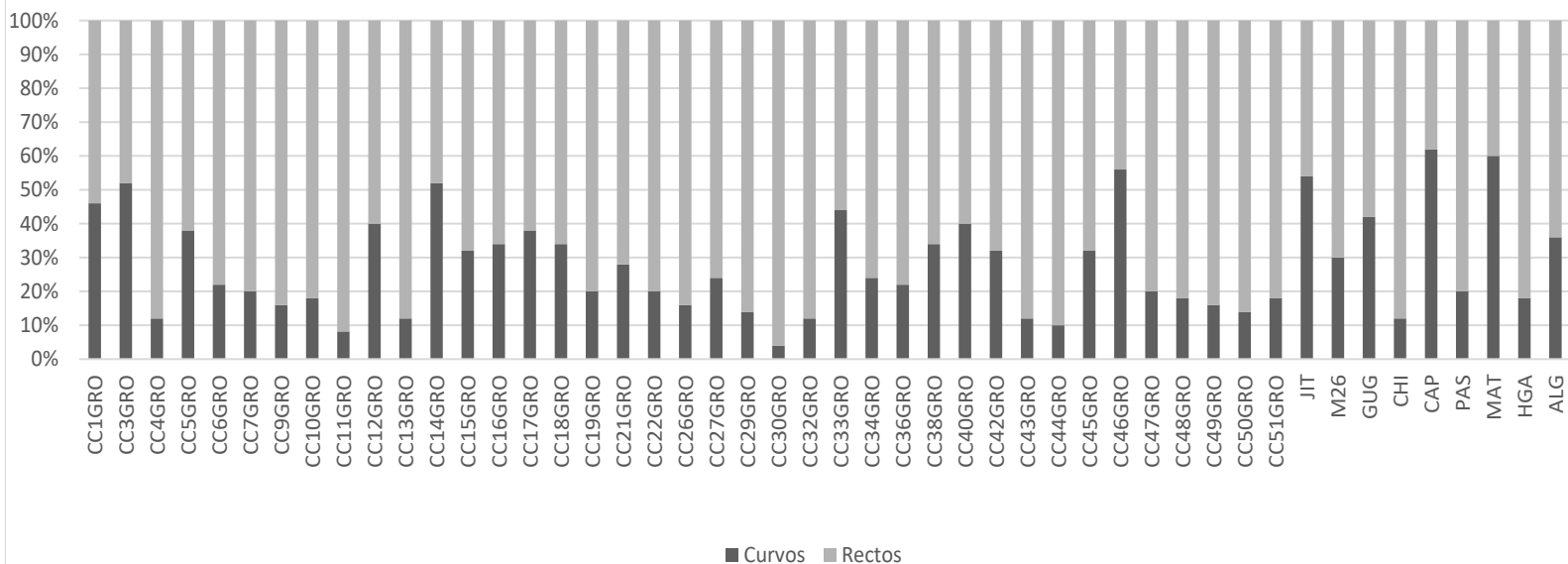


Figura 4. Distribución en porcentaje de contornos de conidios de aislados de *C. cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo.
Figure 4. Distribution in percentage of contours of conidia of *C. cassiicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop.

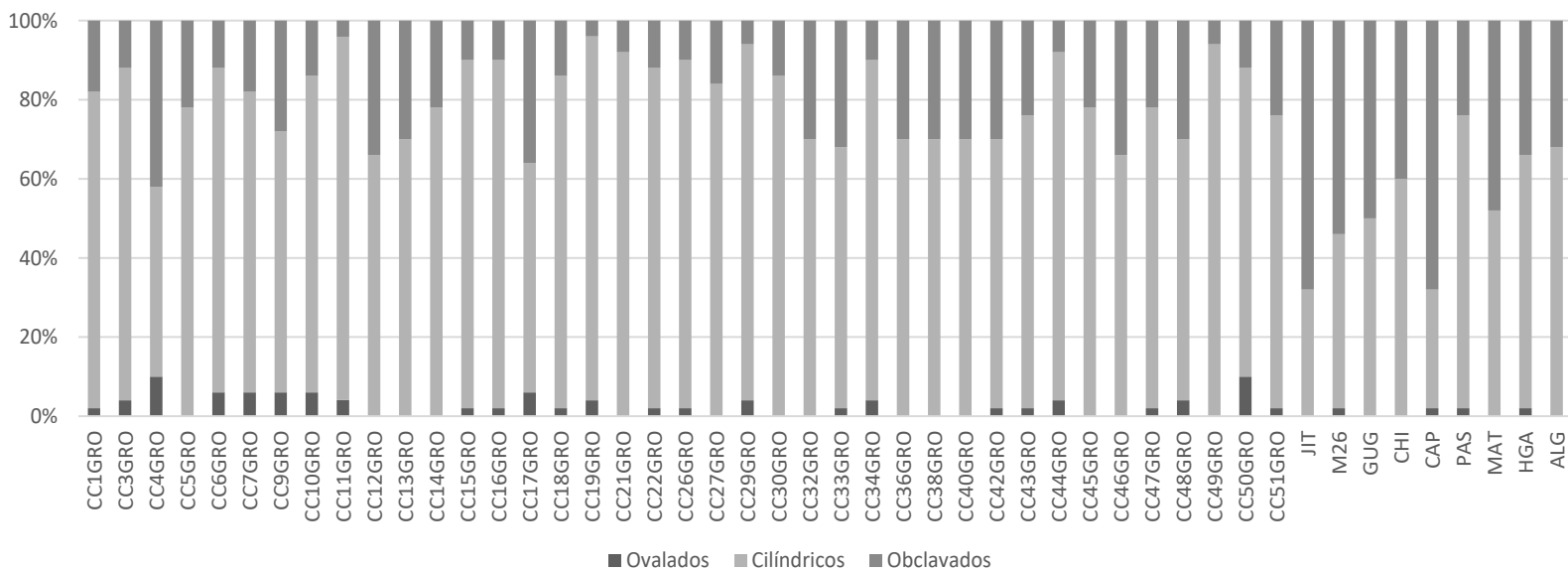


Figura 5. Distribución en porcentaje de formas de conidios de aislados de *C. cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo.
Figure 5. Distribution in percentage of the form of conidia of *C. cassiicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop.

mayor número promedio de pseudoseptos se tuvo en el aislado CAP (cinco pseudoseptos) y el menor promedio en PAS (0.62 pseudoseptos) (Cuadro 3).

Análisis filogenético. Los 48 aislados de *C. cassiicola* del presente estudio se dividieron en dos grupos: grupo uno, integrado por 37 aislados obtenidos de jamaica y ocho aislados de malezas asociadas al cultivo; grupo dos, formado por dos aislados obtenidos de jamaica y uno obtenido de una maleza asociada al cultivo (Figura 3).

DISCUSIÓN

Entre los diferentes aislados analizados de *C. cassiicola*, se registró un alto grado de diferencias en color, textura, forma y tamaño de las colonias, así como en forma, tamaño, contorno y número de pseudoseptos de los conidios (Cuadros 2 y 3, Figuras 2, 4 y 5); lo que coincide con reportes realizados por otros autores (Onesirosan *et al.*, 1974; Nghia *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011). Asimismo, se observaron diferencias genéticas considerando el análisis de un segmento del gen EF-1a, misma que se reportó en Japón por Shimomoto *et al.* (2011) en aislados de *C. cassiicola* obtenidos de *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, entre otras especies vegetales. El análisis comparativo entre las secuencias de los aislados del presente estudio con otras disponibles en el GenBank mostró que los aislados del grupo uno se asociaron con aquellos obtenidos de especies de las familias Apocynaceae (14%), Ericaceae (29%) y Solanaceae (57%), provenientes de Japón, EE.UU. e India; mientras que los del grupo dos, se relacionaron con los obtenidos de especies de las familias Ericaceae (14%), Lamiaceae (14%), Asteraceae (29%) y Cucurbitaceae (43%) provenientes de China, Japón, EE.UU. y Países Bajos. Los resultados anteriores indican

was observed in colony color, texture, form and size, as well as in the form, size, contour and number of conidia pseudosepta (Tables 2 and 3, Figures 2, 4 and 5), which coincides with reports published by other authors (Onesirosan *et al.*, 1974; Nghia *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011). Genetic differences were also observed considering the analysis of a segment of the EF-1a gene, which was reported in Japan by Shimomoto *et al.* (2011) in *C. cassiicola* isolates obtained from *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, among other plant species. The comparative analysis of the isolate sequences obtained in the present study, along with other that were available in the GenBank, showed that the isolates from group 1 were associated with those obtained from species of the Apocynaceae (14%), Ericaceae (29%) and Solanaceae (57%) families from Japan, USA and India, while the isolates of group 2 were associated with those obtained from species of the Ericaceae (14%), Lamiaceae (14%), Asteraceae (29%) and Cucurbitaceae (43%) families from China, Japan, USA and the Netherlands. These results indicate that the Mexican *C. cassiicola* isolates belonging to group 1 are more related to those obtained from plants of the Solanaceae family, while the isolates of group 2 are more associated with species of the Cucurbitaceae family. On the other hand, within group 1, there was a tendency to form a subgroup of isolates collected from weeds associated with the roselle crop in Mexico (Hernández *et al.*, 2018): JIT (*Solanum lycopersicum* (in wild form), M26 (*Chromolaena odorata*), PAS (*Pasiflora viridiflora*), MAT (*Momordica charantia*) and CAP (*Eugenia oerstediana*). The isolates of group 1 were collected in the municipalities of Ayutla, Tecoaapa, Xochistlahuaca and San Marcos, and those of group 2 were collected in the municipality of Ayutla (Figure 3; Table 1). In this regard, it was observed that this group had a certain relationship

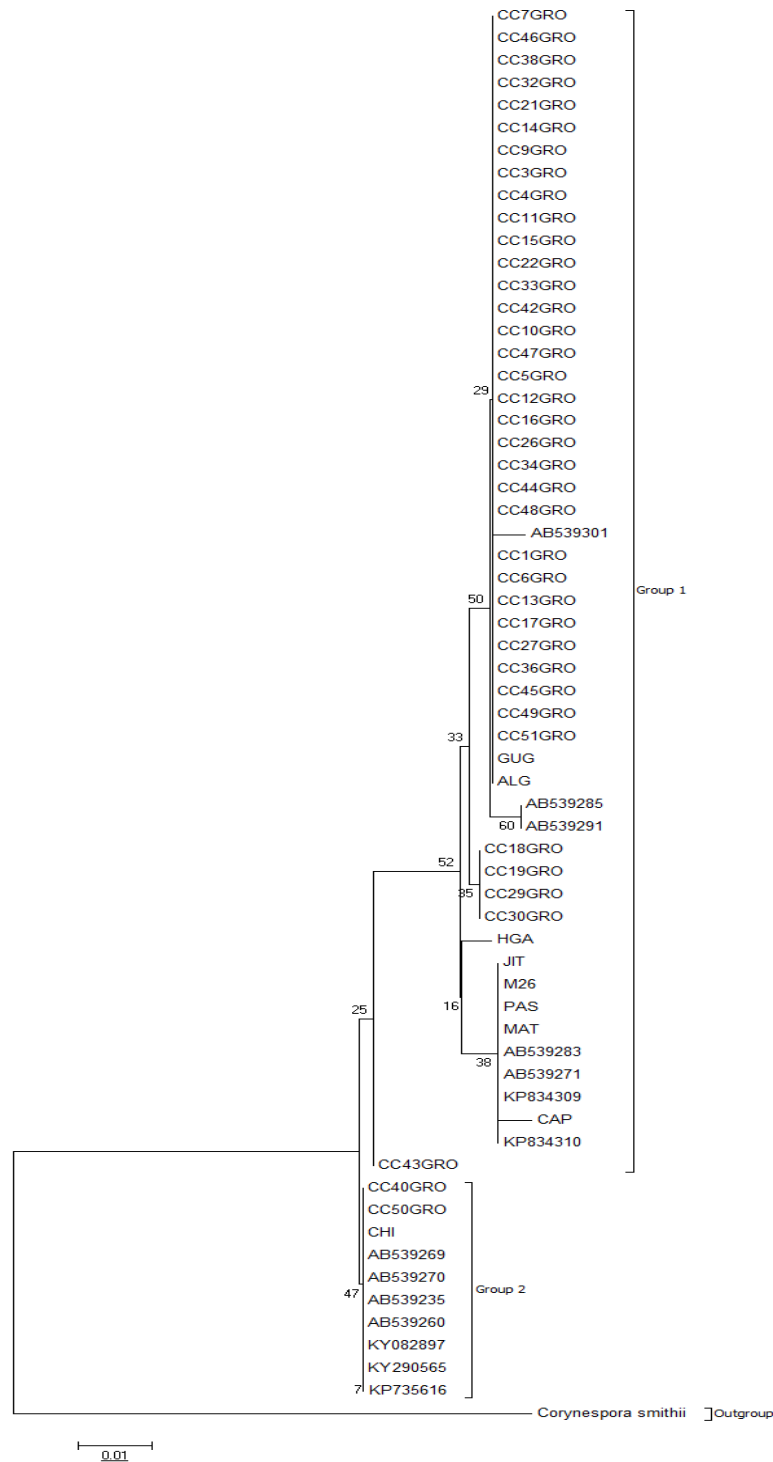


Figura 3. Árbol filogenético de aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo, basado en datos de secuencias parciales del gen EF-1a.-*Corynespora smithii* fue utilizado como organismo fuera de grupo.

Figure 3. Phylogenetic tree of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop based on partial sequences of the EF-1a gene.-*Corynespora smithii* was used as an organism external to the group.

que los aislados mexicanos de *C. cassiicola* pertenecientes al grupo uno están más relacionados con aquellos obtenidos de plantas de la familia Solanaceae, mientras que los del grupo dos se encuentran más asociados con especies de la familia Cucurbitaceae. Por otra parte, dentro del grupo uno se observó una tendencia a formar un sub-grupo de aislados recolectados de malezas asociadas al cultivo de jamaica en México (Hernández *et al.*, 2018): JIT (*Solanum lycopersicum* (forma silvestre), M26 (*Chromolaena odorata*), PAS (*Pasiflora viridiflora*), MAT (*Momordica charantia*) y CAP (*Eugenia oerstediana*). Los aislados del grupo uno se recolectaron en los municipios de Ayutla, Tecoaapa, Xochistlahuaca y San Marcos, mientras que los del grupo dos, procedieron del municipio de Ayutla (Figura 3; Cuadro 1). Al respecto, se observó que este agrupamiento tuvo cierta relación con el lugar de origen, lo cual fue reportado por otros autores (Silva *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009). Dixon *et al.* (2009), analizaron diversos aislados de *C. cassiicola* provenientes de 68 especies vegetales colectadas en Samoa americana, Brasil, Malasia, Micronesia y EE.UU. y determinaron que aquellos geográficamente distintos pero obtenidos de la misma especie vegetal eran muy similares genéticamente, lo cual sugería cierto grado de especialización con el hospedante (Sumabat *et al.*, 2018). La especificidad de aislados de *C. cassiicola* con su hospedante también ha sido sugerida en el caso de papayo, tomate y pepino (Silva *et al.*, 2018).

Sin embargo, hasta la fecha no es posible establecer de manera definitiva una asociación de los grupos filogenéticos de *C. cassiicola* con su origen geográfico u hospedantes (Deon *et al.*, 2014). Además de esto último, trabajos posteriores podrían enfocarse en explorar la variabilidad patogénica de *C. cassiicola* de los grupos formados considerando la amplificación de otras regiones como β -tubulina, calmodulina y actina o el análisis de marcadores

with the place of origin, a fact that was reported by other authors (Silva *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009). Dixon *et al.* (2009) analyzed diverse *C. cassiicola* isolates from 68 plant species collected in American Samoa, Brazil, Malaysia, Micronesia and USA, and determined that those geographically different but obtained from the same plant species were very similar at the genetic level, which suggested a certain level of specialization with the host (Sumabat *et al.*, 2018). The specificity of *C. cassiicola* isolates with their host has also been suggested in the case of papaya, tomato and cucumber (Silva *et al.*, 2018).

However, so far, it has not been possible to definitely establish an association of *C. cassiicola* phylogenetic groups with their geographical origin or hosts (Deon *et al.*, 2014). In addition to the latter, subsequent studies could be focused on exploring the pathogenic variability of *C. cassiicola* in the formed groups considering the amplification of other regions, such as β -tubulin, calmodulin and actin, or the analysis of iPBS markers in order to determine if there is a relationship between the level of pathogenicity with the groups and subgroups formed in the present study and their host.

CONCLUSIONS

The results of the morphological and phylogenetic analyses showed significant differences among the *C. cassiicola* isolates collected from roselle plants and weeds associated with the crop, which are related to isolates from other countries that were obtained mainly from plant species of the Solanaceae and Cucurbitaceae families.

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



iPBS, para determinar si existe relación entre el grado de patogenicidad con los grupos y subgrupos formados en el presente estudio así como con su hospedante.

## CONCLUSIONES

Los resultados del análisis morfológico y filogenético mostraron diferencias importantes entre los aislados de *C. cassiicola* recolectados de plantas de jamaica y malezas asociadas al cultivo, los cuales se relacionan con aislados de otros países y que fueron obtenidos de especies de plantas de las familias Solanaceae y Cucurbitaceae, principalmente.

## LITERATURA CITADA

- Carbone I and Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-6. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Deon M, Fumanal B, Gimenez S, Bieysse D, Oliveira RR and Shuib SS. 2014. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biology* 118: 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.011>
- Dixon LJ, Schlub RL, Pernezny K and Datnoff LE. 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 99:1015-1027. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-9-1015>
- Hernández MJ, Ochoa MDL, Ortega ASÁ and Vega MR. 2018. Survey on alternative hosts of *Corynespora cassiicola*, the cause of the leaf and calyx spot, in the surroundings of roselle fields in Mexico. *Tropical Plant Pathology* 43: 263-270. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0206-9>
- Hernández LRA, Llanderal CC, Castillo MLE, Valdez CJ and Nieto HR. 2005. Identification of larval instars of *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: cossidae). *Agrociencia* 39:539-544. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239507>
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- Nghia NA, Kadir J, Sunderasan E, Abdullah PM, Malik A and Napis S. 2008. Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166:189-201. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9138-8>
- Oktavia F, Kuswanhadi, Widodo, Dinarti D and Sudarsono. 2017. Pathogenicity and RDNA-ITS sequence analysis of the *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Indonesia. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29(11): 872-83. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i11.1497>
- Onesirosan PT, Army DC and Durbin RD. 1974. Hostspecificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 64:1364-1367. <https://doi.org/10.1094/phyto-64-1364>
- Ortega ASÁ, Hernández MJ, Ochoa MDL and Ayala EV. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant Disease* 99:1041. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>
- Paz DS, Gusmão JAR, Costa AA, Silva EKC and Diniz NB. 2018. Reaction of papaya genotypes to target spot and activity of plant extracts and *Bacillus* spp. on *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 40(1): (e-098). <https://doi.org/10.1590/0100-29452018927>
- Qi Y-X, Zhang X, J-J P, Liu X-M, Lu Y, Zhang H, Hui-Qiang Z, YanChao L and Yi-Xian X. 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *European Journal of Plant Pathology* 130:83-95. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9734-6>
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sambrook J. and Russel D. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. *In: Molecular cloning, a laboratory manual* 3<sup>th</sup> Ed. (Green MR and Sambrook J, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 3.17-3.32.
- Shimomoto Y, Sato T, Hojo H, Morita Y, Takeuchi S, Mizumoto H, Kiba A and Hikichi Y. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology* 60:253-260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02374.x>
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (Consulta, febrero 2019).
- Silva WPK, Karunanayake EH, Wijesundera RLC and Priyanka UMS. 2003. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: A possible relationship between host origin and virulence. *Mycological Research* 107:567-571. <https://doi.org/10.1017/s0953756203007755>
- Silva B JL, Galúcio S FM, Gomes L MT, Ferreira V MS, Almeida FV and Rebouças D LC. 2018. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* isolates from Amazonas, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico* 85:1-5. DOI: 10.1590/1808-1657000992017
- Smith LJ, Datnoff LE, Pernezny K and Schlub RL. 2009. Phylogenetic and pathogenic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates. *Acta Horticulturae* 808: 51-56. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.808.6>
- Sumabat L, Robert CK., and Brewer TM. 2018. Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton

and other crops in the southeastern United States. *Phytopathology* 108: 892-901. <https://doi.org/10.1094/phyto-12-17-0407-r>

Wu J, Xie X, Shi Y, Chai A, Wang Q and Li B. 2019. Analysis of pathogenic and genetic variability of *Corynespora cassicola* based on iPBS retrotransposons. *Canadian Journal of Plant Pathology* 41(1):76-86. DOI: 10.1080/07060661.2018.1516239.

# Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*

## Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*

Viridiana López-Bautista, Gustavo Mora-Aguilera\* <sup>1</sup>Programa de Fitosanidad-Fitopatología; María Alejandra Gutiérrez-Espinosa, <sup>2</sup>Programa de Postgrado en Fruticultura; Coral Mendoza-Ramos, Verónica Inés Martínez-Bustamante, Juan José Coria-Contreras, Gerardo Acevedo-Sánchez, Baldemar Santana-Peñaloza <sup>3</sup>Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF), <sup>1,2,3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230 \*Autor para correspondencia: morag@colpos.mx.

Recibido: 14 de Noviembre, 2019.

Aceptado: 20 de Diciembre, 2019.

López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 79-106.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-4

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 29, 2019.

**Resumen.** La marchitez y pudrición seca del cogollo del agave (*Agave tequilana* var. azul) son enfermedades de alto impacto económico para este cultivo. En este trabajo se planteó determinar la implicación de *Fusarium* spp. en ambas enfermedades bajo un enfoque regional. Se colectaron muestras

**Abstract.** Wilt and dry bud rot of the agave (*Agave tequilana* var. azul) are diseases of high economic impact for this crop. The implication of *Fusarium* spp. in both diseases at a regional context was determined in this research. Root and soil samples were collected from 40 commercial plantations located in 13 counties at Los Altos, Jalisco an important cultivation region of agave azul in Mexico; Inoculum charge, as a *Fusarium* Index was obtained base on colony units (*Fusarium* vs total fungi) and its relationship with pH and organic matter were estimated from each sampling plantation. A total of 109 isolates were morphologically characterized as *Fusarium* spp. of which 25 were selected for molecular identification with ITS and EF-1a. The selection considered symptomatology, macro and microscopic characters and prevalence of colony types observed *in vitro* in Komada, Sabouraud, SNA and CLA media. The cultural and

de raíz y suelo en 40 plantaciones comerciales ubicadas en 13 municipios de Los Altos Jalisco, importante región de cultivo de agave azul en México. De cada plantación de colecta se estimó carga de inóculo mediante un índice de *Fusarium* obtenido de unidades formadoras de colonias (*Fusarium* vs hongos totales) y se analizó su relación con pH y materia orgánica. Se obtuvieron 109 aislados caracterizados morfológicamente como *Fusarium* spp. de los cuales se seleccionaron 25 para identificación molecular con ITS y EF-1a. La selección consideró sintomatología, caracteres macro y microscópicos y prevalencia de tipologías de colonia observadas *in vitro* en medios Komada, Sabouraud, SNA y CLA. Los caracteres culturales y morfológicos evaluados fueron: coloración micelial, tamaño, forma y septación de macro y microconidios, y longitud y número de fiálides. Se asociaron cinco especies con marchitez y/o pudrición seca ubicadas en tres complejos filogenéticos: *F. oxysporum* del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC) con 56% (46.2% suelo y 66.7% raíz) de representatividad regional; *F. solani*, *F. falciforme* y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium solani* (FSSC) (40%); y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (4%). MO y pH tuvieron correlación inversamente proporcional con Índice de *Fusarium* ( $r^2 = 0.68-0.70$ ). Se postula que la marchitez y pudrición seca del cogollo de agave azul constituyen un síndrome en el cual se asocian y especializan parasíticamente diversas especies de *Fusarium*. Se encontró un aislado de los tres complejos de *Fusarium* asociados específicamente a cada tipo de síntoma y la combinación de ellos. La mayoría se asociaron a marchitez con predominancia de *F. oxysporum*.

**Palabras clave:** Agave azul, suelo, raíz, prevalencia, EF-1a.

morphological characters evaluated were mycelial coloration, size, shape and septation of macro and microconidia, and length and number of phialides. Five species were associated with wilt and/or dry bud rot within three phylogenetic complexes: *F. oxysporum* of the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) with 56% (46.2 % soil y 66.7 % root) regional representation; *F. solani*, *F. falciforme* and *Fusarium* sp. of *Fusarium solani* complex (FSSC) (40%); and *Fusarium* sp. of *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) (4%). MO and pH correlated inversely with *Fusarium* Index ( $r^2=0.68-0.70$ ). It is postulated that wilt and dry bud rot of blue agave constitute a syndrome in which several *Fusarium* species are associated and parasitically specialized. A single isolate per each species complex was found associated specifically to each or both symptoms. Most isolates were associated to wilting with prevalence of *F. oxysporum*.

**Key words:** Blue agave, soil, root, prevalence, EF-1a.

Mexico holds the Tequila Designation of Origin (DOT) since 1997, consisting of 181 counties distributed in the states of Nayarit (8), Guanajuato (7), Tamaulipas (11), Michoacán (30) and Jalisco with 125, of which 21 are at Los Altos region (CRT, 2017). In 2018, the primary production of blue agave (*Agave tequilana* var. azul) as prime product for tequila processing involved 64,582.76 has equivalent to 206.6 million plants, with 57% of the production concentrated at Los Altos (SIAP, 2018).

In the last 20 years blue agave production has been primarily affected by wilting and dry bud rot (Rubio, 2007; Gómez-Ortiz *et al.*, 2011). Vascular wilt begins with curled tip leaved due to obstruction and plugging of vascular bundles that cause

México ostenta la Denominación de Origen del Tequila (DOT) desde 1997, conformada por 181 municipios distribuidos en los estados de Nayarit (8), Guanajuato (7), Tamaulipas (11), Michoacán (30) y Jalisco con 125 municipios, de los cuales 21 se encuentran en la región de Los Altos (CRT, 2017). En 2018, la producción primaria de agave azul (*Agave tequilana* var. azul) como materia prima para elaboración de tequila implicó 64,582.76 ha equivalente a 206.6 millones de plantas, concentrándose en Los Altos el 57% de la producción (SIAP, 2018).

En los últimos 20 años, la producción de agave azul ha sido afectada primariamente por marchitez y pudrición seca del cogollo (Rubio, 2007; Gómez-Ortiz *et al.*, 2011). La marchitez vascular inicia con enrollamiento de punta de hojas por obstrucción y taponamiento de haces vasculares que provocan deshidratación y muerte progresiva de tejidos, seguido de cambio de coloración de azul turquesa a verde opaco; en etapa avanzada de enfermedad, las plantas muestran enrollamiento foliar firme, y eventualmente coriáceo, mayor al 50% del área foliar; en la mayoría de casos se pierde anclaje por reducción o destrucción total del sistema raíz (Jiménez-González *et al.*, 2017). Etiológicamente se ha reportado la asociación de diversos organismos entre ellos, *F. oxysporum* y *F. solani* (Rubio, 2007; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). En contraparte, plantas con pudrición seca del cogollo se caracterizan por lesiones corrugadas de color negro y amarillo-pálido que descienden desde la punta a base del cogollo. Inicialmente, la pudrición se restringe al ápice interno del cogollo. A diferencia de mancha gris por *Cercospora* (Coria-Contreras *et al.*, 2019) o pudrición blanda, el cogollo mantiene su textura rígida, sin colapso, y no presenta olor fétido. El agente causal de pudrición seca también se ha asociado a *Fusarium* sp. (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011), mientras que

dehydration and progressive tissue death, followed by a change in color from turquoise to opaque green. In advanced disease stages, plants show firm leaf curl, and eventually coriaceous, greater than 50% of the foliage area. In most cases, anchorage is lost due to reduction or total destruction of the root system (Jiménez-González *et al.*, 2017). Etiologically, the association of various organisms, among them; *F. oxysporum* and *F. solani* (Rubio, 2007; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017) has been reported. In contrast, plants with dry bud rot are characterized by corrugated lesions of black and yellow-pale color that descend from tip to base of the bud. Initially, rot is restricted to the inner apex of the bud. Unlike gray spot by *Cercospora* (Coria-Contreras *et al.*, 2019) or soft rot, the bud maintains its rigid texture, without collapse, and has no foul odor. The causal agent of dry rot has also been associated with *Fusarium* sp. (Gómez-Ortiz, 2011), whereas in soft rot it has been associated to *Pectobacterium* spp. and *Erwinia* sp. (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014). Of the three types of bud rot, the dry one has a higher occurrence although lesser than that of wilting ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)). In some subregions and farms with high wilt intensity, dry rot can occur in the same plant. Although the official phytosanitary campaign of agave was established in 2013 these diseases repeatedly implicate production inventories due to the absence of effective management methods and abandonment of commercial plantations infested during low-price cyclical periods.

Although classical morphological characterization is important to identify *Fusarium* spp. (Leslie and Summerell, 2006; Ceja-Torres *et al.*, 2008), increase in diseases and epidemics caused by this genus and its taxonomic complexity justifies the use of molecular techniques for species identification, population structure and phylogeny

en pudrición blanda se ha reportado a *Pectobacterium* spp. y *Erwinia* sp. (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014). De los tres tipos de pudrición de cogollo, la seca tiene mayor ocurrencia aunque menor a marchitez ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)). En algunas subregiones y predios con alta intensidad de marchitez, la pudrición seca puede concurrir en la misma planta. Aunque en 2013 se estableció la campaña oficial fitosanitaria del agave, recurrentemente estas enfermedades comprometen inventarios productivos debido a la ausencia de métodos efectivos de manejo y por abandono de plantaciones comerciales infestadas durante periodos cíclicos de bajo precio.

Aunque la caracterización morfológica clásica es importante para identificar *Fusarium* spp. (Leslie y Summerell, 2006; Ceja-Torres *et al.*, 2008), el incremento de enfermedades y epidemias causadas por este género y su complejidad taxonómica justifica el empleo de técnicas moleculares para identificación de especies, estructura poblacional y filogenia (Liew *et al.*, 2016; Herrera-Parra *et al.*, 2017; Parra-Cota *et al.*, 2018; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2018). Convencionalmente, la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADN ribosómico nuclear se ha empleado en *Fusarium* y hongos en general (O'Donnell *et al.*, 2015). Sin embargo, es consenso actual que *Fusarium* se debe analizar con genes asociados al factor de elongación (EF-1a), a la subunidad mayor de ARN polimerasa I (RPB1), y segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II (RPB2) (O'Donnell *et al.*, 2015). La presente investigación tuvo como objetivo identificar las especies de *Fusarium* obtenidas de raíz y suelo de plantaciones comerciales de agave azul asociadas a marchitez y pudrición seca del cogollo en Los Altos, Jalisco, mediante técnicas morfológicas, epidemiológicas y moleculares con la finalidad de conocer la diversidad y prevalencia regional que coadyuve al establecimiento de estrategias metodológicas, operativas y de manejo que sustenten

(Liew *et al.*, 2016; Herrera-Parra *et al.*, 2017; Parra-Cota *et al.*, 2018; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2018). Conventionally, the internal transcribed spacer region (STI) of nuclear ribosomal DNA has been used in *Fusarium* and fungi in general (O'Donnell *et al.*, 2015). However, the current consensus on *Fusarium* is that it should be analyzed with genes associated with the elongation factor (EF-1a), the major RNA polymerase I subunit (RPB1) and second largest subunit (RPB2) (O'Donnell *et al.*, 2015). The objective of this research was to identify the *Fusarium* species obtained from the root and soil of commercial blue agave plantations associated with wilting and dry bud in Los Altos, Jalisco through morphological, epidemiological and molecular techniques in order to know the diversity and regional prevalence that contributes to the establishment of methodological, operational and management strategies that support the Agave Phytosanitary Integral System (SIVEA), the basis of the agave phytosanitary campaign.

## MATERIALS AND METHODS

**Study area.** The sample collection was carried out in 40 commercial plantations of 3-4 years distributed in 13 counties of Los Altos, Jalisco (Table 1). Plantations were selected using epidemic inductive criteria integrated in the REG-N methodology (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Coria-Contreras *et al.*, 2018). Additionally, the predominant planting symptomatology and phytosanitary condition was considered: wilting (M), dry bud rot (P), apparently healthy (AS) and unproductive (IP). The IP plots were chosen because of its high incidence backgrounds, causing their abandonment for commercial agave production.

**Sampling method.** In plantations with M and P, sampling was carried out around initial foci with

el Sistema Integral de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del agave (SIVEA), base de la campaña fitosanitaria del agave.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** La colecta de muestras se realizó en 40 plantaciones comerciales de 3-4 años distribuidas en 13 municipios de Los Altos, Jalisco (Cuadro 1). Las plantaciones se seleccionaron mediante criterios de inductividad epidémica integrados en la metodología REG-N (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Coria-Contreras *et al.*, 2019). Adicionalmente se consideró la sintomatología y condición fitosanitaria predominante de plantación: marchitez (M), pudrición seca de cogollo (P), aparentemente sano (AS) e improductivos (IP). Las parcelas IP fueron elegidas por antecedentes de incidencia alta, causando su abandono para producción comercial de agave.

**Método de muestreo.** En plantaciones con M y P, el muestreo se realizó en torno a focos iniciales con 1-4 plantas contiguas con severidad 3-4 de marchitez (M) y/o 3-5 de pudrición seca (P) según clases de escala diagramática propuesta por Jiménez-González y colaboradores (2017). Se integraron cinco submuestras, dos intra-foco y tres de perifoco, para conformar una muestra compuesta de 500 g de suelo y raíces. La submuestra se tomó con una pala cilíndrica metálica diseñada para estandarizar el volumen de colecta a 10 cm del cuello de planta y a 35 cm de profundidad. Para AS se aplicó misma metodología en una sección interna de plantación en torno a plantas aparentemente sanas. En parcelas IP, la muestra compuesta consistió únicamente de suelo colectado en el tercio medio del predio. Cada muestra compuesta se dividió para análisis microbiológico y fisicoquímico. Este último

1-4 contiguous plants with 3-4 severity wilt (M) and / or 3-5 dry rot (P) according to classes of diagrammatic scales proposed by Jiménez-González *et al.* (2017). Five subsamples, two intra-focal and three peripheral, were integrated to form a sample composed of 300 g of soil and roots. The subsample was taken with a metal cylindrical shovel designed to standardize the collection volume at 10 cm from the plant neck and at 35 cm depth. For AS, the same methodology was applied in an internal section of the plantation around apparently healthy plants. In IP plots, the compound sample consisted solely of soil collected in the middle third of the land. Each compound sample was divided for microbiological analysis and physicochemical analysis. The latter was carried out in the soil fertility laboratory of the Colegio de Postgraduados.

### Isolates and morphological characterization.

*Fusarium* isolates were obtained from soil samples by dilutions of stock solution (SM), for which 5 g of soil, properly homogenized and grounded were placed in Falcon tubes with 45 mL of sterile distilled water (1:9/p:v). The mixture was homogenized by a stirring equipment for 5 minutes. A  $1 \times 10^{0.5}$  dilution, obtained with 1 mL of SM in 1 mL of sterile distilled water was selected to optimize the colony count. Through a Drigalsky spatula, a 0.1 mL aliquot was distributed in a modified Komada medium, with three Petri dishes as repetitions. The PCNB in Komada was added previous to the sterilization in order to reduce its fungicidal effectiveness and allow a controlled growth of other fungi besides *Fusarium*. The root tissue (<0.5cm) was disinfested for 1 min with 2% hypochlorite, followed by 1 min in 70% alcohol and three washes with sterile distilled water. Four 1 cm pieces were sown per Petri dish; each piece of tissue was taken as a repetition. Sowings were incubated at 28 °C for 5-7 days. Subsequently, putative *Fusarium* colonies

**Cuadro 1. Condición fitosanitaria, identificación y localización de 40 plantaciones comerciales de *Agave tequilana* de 3-4 años de edad, seleccionadas por criterios de inductividad epidémica para estudio etiológico regional de marchitez y pudrición seca del cogollo del agave en Los Altos, Jalisco. Verano 2016.**

**Table 1. Phytosanitary condition, identification and location of 40 commercial plantations of *Agave tequilana* 3-4 years old, selected by criteria of epidemic inductivity for regional etiological study of wilting and dry bud rot at Los Altos, Jalisco. Summer 2016.**

| Condición Fitosanitaria    | Municipio         | Latitud     | Longitud    | Altitud (msnm) | ID Plantación |
|----------------------------|-------------------|-------------|-------------|----------------|---------------|
| Marchitez de planta        | Arandas           | 20.695398   | -102.326988 | 2082           | A-ARA-M09     |
|                            |                   | 20.850716   | -102.158635 | 1954           | A-ARA-M10     |
|                            | Atotonilco A.     | 20.580920   | -102.516410 | 1940           | A-ATO-M04     |
|                            |                   | 20.515050   | -102.612560 | 1624           | A-ATO-M03     |
|                            |                   | 20.56022    | -102.53321  | 1911           | A-ATO-M15     |
|                            | Jesús María       | 20.630650   | -102.213000 | 2132           | A-JM-M11      |
|                            |                   | 20.613504   | -102.266203 | 2026           | A-JM-M12      |
|                            |                   | 20.707930   | -102.122470 | 2235           | A-JM-M14      |
|                            | Ayotlán           | 20.595730   | -102.156940 | 2172           | A-JM-M13      |
|                            |                   | 20.606100   | -102.378590 | 1946           | A-AYO-M06     |
|                            |                   | 20.601070   | -102.402080 | 1901           | A-AYO-M05     |
|                            |                   | 20.674480   | -102.505280 | 1949           | A-SICG-M08    |
|                            | San Ignacio C. G. | 20.724880   | -102.467340 | 2014           | A-SICG-M07    |
|                            |                   | Poncitlán   | 20.367180   | -102.836960    | 1533          |
| Zapotlanejo                | 20.575610         | -102.889340 | 1556        | A-ZAP-M02      |               |
| Pudrición seca del cogollo | Arandas           | 20.683519   | -102.264241 | 2003           | A-ARA-P11     |
|                            |                   | 20.745702   | -102.324358 | 2222           | A-ARA-P05     |
|                            |                   | 20.694717   | -102.324106 | 2243           | A-ARA-P10     |
|                            |                   | 20.631250   | -102.272260 | 2053           | A-ARA-P12     |
|                            | Jesús María       | 20.723180   | -102.127880 | 2271           | A-JM-P14      |
|                            |                   | 20.708100   | -102.122040 | 2238           | A-JM-P13      |
|                            |                   | 20.692854   | -102.065208 | 2250           | A-JM-P15      |
|                            | Atotonilco A.     | 20.588600   | -102.513800 | 1826           | A-ATO-P06     |
|                            |                   | 20.634495   | -102.435671 | 1957           | A-ATO-P07     |
|                            | Ayotlán           | 20.581670   | -102.370740 | 1944           | A-AYO-P08     |
|                            | Poncitlán         | 20.36105    | -102.96944  | 1618           | A-PON-P03     |
|                            | San Ignacio C. G. | 20.723920   | -102.493020 | 2018           | A-SICG-P09    |
|                            | Tepatitlán M.     | 20.649600   | -102.632200 | 1915           | A-TEP-P02     |
|                            | Yahualica G. G.   | 21.113520   | -102.866870 | 1824           | A-YAH-P01     |
| Zapotlanejo                | 20.576420         | -102.889370 | 1869        | A-ZAP-P04      |               |
| Improductivos              | Cuquío            | 21.016096   | -103.006563 | 1810           | A-CUQ-IP01    |
|                            |                   | 20.98254    | -103.02026  | 1860           | A-CUQ-IP02    |
|                            | Degollado         | 20.42574    | -102.13187  | 1723           | A-DEG-IP07    |
|                            |                   | 20.46372    | -102.21277  | 1748           | A-DEG-IP08    |
|                            | Tepatitlán M.     | 20.63825    | -102.90195  | 1751           | A-TEP-IP05    |
|                            |                   | 20.63964    | -102.638365 | 1904           | A-TEP-IP04    |
|                            | San Miguel A.     | 20.89801    | -102.40221  | 2049           | A-SMA-IP06    |
| Acatic                     | 20.783383         | -102.887821 | 1685        | A-ACA-IP03     |               |
| Aparentemente sanos        | Jesús María       | 20.594201   | -102.156956 | 2176           | A-JM-AS01     |
|                            | Atotonilco A.     | 20.662899   | -102.472285 | 1840           | A-ATO-AS02    |



se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

**Aislados y caracterización morfológica.** Aislados de *Fusarium* se obtuvieron a partir de muestras de suelo mediante diluciones de solución madre (SM), para la cual se colocaron 5 g de suelo, debidamente homogeneizado y triturado, en tubos Falcon con 45 mL de agua destilada estéril (1:9/p:v). La mezcla se homogeneizó mediante agitación en Vortex por 5 min. Se seleccionó una dilución  $1 \times 10^{0.5}$ , obtenida con 1 mL de SM en 1 mL de agua destilada estéril, para optimizar el conteo de colonias. Mediante espátula Drigalsky se distribuyó una alícuota de 0.1 mL en medio Komada modificado, con tres cajas Petri como repeticiones. El PCNB en Komada se adicionó previo a la esterilización para reducir su efectividad fungicida y permitir el crecimiento controlado de otros hongos además de *Fusarium*. El tejido de raíz (<0.5cm) se desinfectó por 1 min con hipoclorito al 2%, seguido de 1 min en alcohol 70% y tres lavados con agua destilada estéril. Cuatro trozos de 1 cm se sembraron por caja Petri; cada trozo de tejido se tomó como una repetición. Las siembras se incubaron a 28 °C durante 5-7 días. Posteriormente, putativas colonias de *Fusarium* se transfirieron a medio SNA-Agar modificado (Leslie y Summerell, 2006). Se incubaron durante cinco días y se obtuvieron 1-2 cultivos monospóricos por aislado usando una dilución de conidios de  $1 \times 10^6$ . La caracterización de aislados se realizó con crecimientos en medios Komada, SNA, CLA, PDA y Sabouraud según el atributo de interés (Leslie y Summerell, 2006). Los caracteres analizados fueron: coloración micelial; presencia o ausencia de monofialides, polifialides, clamidosporas, células conidiogénicas; y tipo, forma, septos y tamaño de conidios (Leslie y Summerell, 2006; Gogoi *et al.*, 2017). Las observaciones se realizaron en un microscopio Carl Zeiss modelo Axio Imager A1

were transferred to a modified SNA-Agar medium (Leslie and Summerell, 2006). They were incubated for five days and 1-2 monosporic cultures were obtained per isolate.

The characterization of isolates was performed with their growth in Komada, SNA, CLA, PDA and Sabouraud media according to the attribute of interest (Leslie and Summerell, 2006). The analyzed characters were: mycelial coloration; presence or absence of monofialides, polyhalides, klamidospora, conidiogenous cells, and type, shape, septa and size of conidia (Leslie and Summerell, 2006). The observations were made in a Carl Zeiss microscope model Axio Imager A1 with AxioCam ICc1 image analysis system and the AxioVision digital program.

**DNA extraction, PCR and sequencing.** For the molecular identification a total of 13 monosporic isolates obtained from soil and 12 from the root were selected by their representativeness out of 109 isolates based on *in vitro* cultural characteristics, morphology, source of isolation, prevalence and regional disease inductivity. Genomic DNA was extracted by the Sambrook and Russell method. The DNA concentration and quality was verified with NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) and the concentration was homogenized at 40 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  for the polymerase chain reaction (PCR). The ITS region of the ribosomal DNA was amplified using the published parameters (White *et al.*, 1990) and the elongation factor gene (*EF-1a*) with the initiators EF1 \* (5'-ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2 \* (5'- GGA DGT ACC AGT RAT CAT G). Each PCR reaction for *EF-1a* consisted of a mixture of 0.8 X of PCR buffer solution, 1.6 mM of  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 0.2  $\mu\text{M}$  of deoxynucleotide triphosphate (dNTP's), 0.2 pmol of each initiator, 0.5 units of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 2.5  $\mu\text{L}$  of DNA (40 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) at

con sistema de análisis de imagen AxioCam ICc1 y el programa digital AxioVision.

**Extracción de ADN, PCR y secuenciación.** Para la identificación molecular, de un total de 109 aislados se seleccionaron por representatividad 13 aislados monospóricos obtenidos de suelo y 12 de raíz, con base a características culturales *in vitro*, morfología, fuente de aislamiento, prevalencia e inducibilidad regional de enfermedad. El ADN genómico se extrajo por el método Sambrook y Russell. La concentración y calidad del ADN se verificó con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) y se homogeneizó a 40 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se amplificó la región ITS del ADN ribosomal usando los parámetros publicados (White *et al.*, 1990) y el gen factor de elongación (EF-1a) con los iniciadores EF1\* (5' – ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2\* (5' – GGA DGT ACC AGT RAT CAT G). Cada reacción PCR para EF-1a consistió en una mezcla de 0.8 X de solución buffer de PCR, 1.6 mM de  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 0.2  $\mu\text{M}$  de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), 0.2 pmol de cada iniciador, 0.5 unidades de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 2.5  $\mu\text{L}$  de ADN (40 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Las condiciones PCR en termociclador (T-100, BioRad) consistieron de un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 30 s, a 58 °C por 40 s y a 72 °C por 55 s y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de ambas amplificaciones fueron analizados en gel agarosa 1.5% a 90 Volts por 90 min, se tiñó con bromuro de etidio y se reveló con luz UV en fotodocumentador (UVP, BioImaging Systems, Epi Chemi II Darkroom). Los fragmentos amplificados de 550 y 750 pb aproximadamente se secuenciaron en Macrogen Inc., Korea.

**Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.** Las secuencias se editaron con el programa

a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . The PCR conditions in thermal cycler (T-100, BioRad) consisted of an initial cycle of denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, at 58 °C for 40 s and 72 °C for 55 s and a final extension at 72 °C for 7 min. The products of both amplifications were analyzed in 1.5% agarose gel at 90 Volts for 90 min, stained with ethidium bromide and developed with UV photodocumenting light (UVP, BioImaging Systems, Epi Chemi II Darkroom). The amplified fragments of approximately 550 and 750 bp were sequenced by Macrogen Inc., Korea.

#### **Sequence alignment and phylogenetic analysis.**

The sequences were edited with the SeqAssem program and compared by BLASTn with the *Fusarium*-ID, *Fusarium*-MLST and GenBank databases to determine taxon identity based on comparative sequence similarity, expressed as identity percentage. To determine phylogenetic relationships and confirm identification, the sequences obtained were aligned with GenBank reference sequences, using the MUSCLE and Maximum likelihood (ML) algorithm in MEGA7 with 1000 Bootstrap replications. The model selected for ML was Kimura-2 parameters +G. *F. dimerum* (NRRL 36140) was integrated as an external group. Representative sequences of *Fusarium* sp. were recorded in Genbank. with accession number MH172303 for the FOSC complex and MH179126 for the FSSC complex.

**Regional analysis of *Fusarium* Index.** Samples from soil were only used to evaluate the number of colonies (*n*) of *Fusarium* spp. and of total fungi in Komada cultivate medium at seven days of incubation. Each sample had three repetitions consisting of the same number of Petri dishes 90x15 mm. The *Fusarium* Index (IF) was generated as,  $IF = (n - \text{colonias } Fusarium \text{ spp}) / (n - \text{hongos totales})$  where  $IF \approx 1.0$  indicates higher charge of *Fusarium* spp. in the soil sample.

SeqAssem y se compararon mediante BLASTn con bases de datos *Fusarium*-ID, *Fusarium*-MLST y GenBank para determinar identidad de taxones con base en similitud comparativa de secuencias, expresado en porcentaje de identidad. Para determinar relaciones filogenéticas y confirmar la identificación, las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias de referencia del GenBank, utilizando el algoritmo MUSCLE y se analizaron con Máxima verosimilitud (ML) en MEGA7 con 1000 repeticiones Bootstrap. El modelo seleccionado para ML fue Kimura-2 parámetros +G. Se integró a *F. dimerum* (NRRL 36140) como grupo externo. Secuencias representativas de *Fusarium* sp. fueron registradas en Genbank. con número de accesión MH172303 para el complejo FOOSC y MH179126 para el complejo FSSC.

**Cálculo del Índice de *Fusarium*.** Únicamente de muestras de suelo, el número de unidades formadoras de colonia ( $n$ ) de *Fusarium* spp. y de hongos totales se contabilizó en medio de cultivo Komada a siete días de incubación. Cada muestra tuvo tres repeticiones consistentes en igual número de cajas Petri 90x15 mm. El Índice de *Fusarium* ( $IF$ ) se generó como  $IF = (n - \text{colonias } Fusarium \text{ spp}) / (n - \text{hongos totales})$ , donde  $IF \approx 1.0$  indica mayor carga de *Fusarium* spp. en la muestra de suelo.

**Análisis del índice de *Fusarium* con pH y Materia orgánica.** Se analizó la dependencia univariada del Índice de *Fusarium* ( $IF$ ) con pH y materia orgánica (MO) por medio de adaptaciones a los modelos exponencial negativo [ $\ln(y) = a - b(x)$ ] y Gregory [ $\ln(y) = a - b \ln(x)$ ]; donde  $y$  representa el Índice de *Fusarium*,  $x$  valores de pH y MO,  $a$  y  $b$  son parámetros de ajuste y tasa, respectivamente. Un total de 28 parcelas comerciales con análisis de pH y MO fueron incluidas en este análisis.

***Fusarium* index analysis with pH and organic matter.** Univariate dependence of the *Fusarium* Index ( $IF$ ) with pH and organic matter (MO) was analyzed throughout adaptations to the negative exponential models [ $\ln(y) = a - b(x)$ ] and Gregory [ $\ln(y) = a - b \ln(x)$ ]; where  $y$  represents the *Fusarium* Index,  $x$  values of pH and MO,  $a$  and  $b$  are parameters of adjustment and rate, respectively. A total of 28 commercial plots with pH and MO analyzes were included in this analysis.

## RESULTS

### **Morphological and cultural characterization.**

A total of 109 *Fusarium* isolates were obtained from 248 *in vitro* cultures from 40 soil samples (57 isolates) and 32 from root (52). The Komada medium, due to its specificity to *Fusarium*, was suitable to isolate the fungus from both soil and root and to evaluate mycelial texture and coloration. CLA and SNA were optimal for inducing sporulation and evaluating spore type and septation. These mediums were complementary by differential response between strains (Table 2). In CLA and SNA, macroconidia predominated in a straight to slightly curved and falcate manner, from three to six cells, grouping into two groups: group A included strains with macroconidia of an average length of 26.01  $\mu\text{m}$  (range: 17.12-57.62  $\mu\text{m}$ ), and group B with a mean of 33.19  $\mu\text{m}$  (27.16-48.8  $\mu\text{m}$ ). One strain presented macroconidia with a length of 76.45  $\mu\text{m}$  (Figure 1A-D). Ellipsoidal microconidia without septa and arranged in false heads in monophialids characterized group A, while in group B they presented a septum. In general, the microconidia had an average length of 10  $\mu\text{m}$  and a range of 3.7-12.4  $\mu\text{m}$  (Figure 1E-F). The size of phialides was decisive to differentiate

## RESULTADOS

**Caracterización morfológica y cultural.** Un total de 109 aislados de *Fusarium* se obtuvieron a partir de 248 siembras *in vitro* provenientes de 40 muestras de suelo (57 aislados) y 32 de raíz (52). El medio Komada, por su especificidad a *Fusarium*, fue adecuado para aislar al hongo tanto de suelo como de raíz y para evaluar textura y coloración micelial. CLA y SNA fueron óptimos para inducir esporulación y evaluar tipo de esporas y septación. Estos medios fueron complementarios por respuesta diferencial entre cepas (Cuadro 2). En CLA y SNA, predominaron macroconidios de forma recta a ligeramente curva y falcada, de tres a seis células, agrupándose en dos grupos: grupo A incluyó cepas con macroconidios de longitud media de 26.01  $\mu\text{m}$  (rango: 17.12-57.62  $\mu\text{m}$ ), y grupo B con media de 33.19  $\mu\text{m}$  (27.16-48.8  $\mu\text{m}$ ). Una cepa presentó

between strains of group A and B. In the first case short phialides were observed with average length of 23.43  $\mu\text{m}$  (Figure 1G-H) against long phialides of 147.91  $\mu\text{m}$  on average of group B (Figure 1I -J). Chlamydospores were scarce in most strains; however, some isolates of both groups formed them individually or in a chain (Figure 1K). The morphological characteristics found and their variability matched the taxonomic description of the genus *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006). The 109 isolates were placed at SENASICA-DGSV-CNRF collection. Isolates registered in genbank NCBI were: A115a=MH172303; A129a=MH179126.

In Komada, the isolates showed differences in mycelial texture with a smooth and cottony predominance. Ten colors were distinguished by colorimetry, highlighting white, purple, pinkish, 'salmon' and 'melon' (Figure 1L-P). In 57 root

**Cuadro 2. Medios de cultivo seleccionados para aislamiento, purificación, caracterización cultural y morfológica de *Fusarium* spp. a partir de 248 siembras, provenientes de 40 plantaciones comerciales y 72 muestras de suelo y raíz de agave azul. Verano, 2016. Los Altos, Jalisco.**

**Table 2. Culture media selected for isolation, purification, cultural and morphological characterization of *Fusarium* spp. from 248 cultural sowings, from 40 commercial plantations and 72 samples of soil and blue agave root. Summer, 2016. Los Altos, Jalisco.**

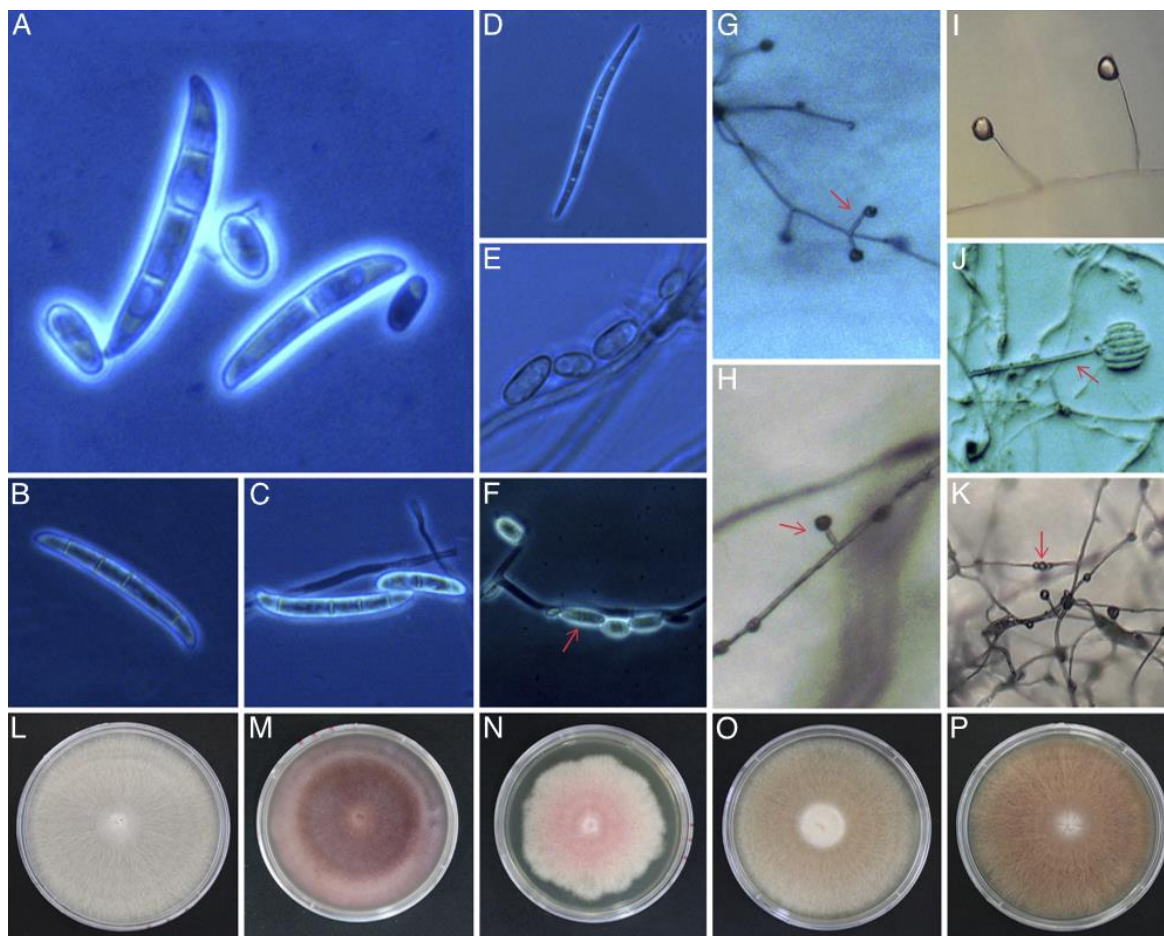
| Medio de cultivo <sup>x</sup> | Objetivo                                          | Coloración | Características observadas <sup>y</sup> |         |           |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|------------|-----------------------------------------|---------|-----------|
|                               |                                                   |            | Esporulación                            | Esporas | Septación |
| Komada                        | Aislamiento                                       | +          | -                                       | -       | -         |
| SNA                           | Inducción de esporulación y purificación          | -          | +                                       | -       | -         |
| CLA                           | Caracterización morfológica de esporas            | -          | +                                       | +       | +         |
| PDA                           | Caracterización cultural de colonias              | +          | -                                       | -       | -         |
| Sabouraud                     | Purificación y obtención de cultivos monospóricos | +          | -                                       | -       | -         |

<sup>x</sup>SNA= Spezieller Nährstoffarmer Agar; CLA= agar hojas de clavel; PDA= agar papa dextrosa / SNA = Spezieller Nährstoffarmer Agar; CLA = carnation leaf agar; PDA = potato dextrose agar.

<sup>y</sup>Coloración= evaluación del color de 109 colonias con 7-10 días de crecimiento; Esporulación= cuantificación cualitativa de la producción de esporas (alta, media y baja); Esporas= presencia o ausencia y tamaño de macro y microconidios; tipo de clamidospora; Septación= cuantificación del número de septos en macro y microconidios / Coloration = color evaluation of 109 colonies at 7-10 days cultural growth; Sporulation = qualitative quantification of spore production (high, medium and low); Spores = presence or absence and size of macro and microconidia; type of clamidospora; Septation = quantification of number of septa in macro and microconidia.

macroconidios con longitud de 76.45  $\mu\text{m}$  (Figura 1 A-D). Microconidios elipsoidales, sin septos y dispuestos en falsas cabezas en monofiálides caracterizaron al grupo A, mientras que en el grupo

isolates, from eight counties, six colors with greater frequency of white mycelium were determined in 19/57 isolates (33.3%), mainly in wilted plantations (Figure 2A), followed by pinkish isolates. In 52



**Figura 1.** Ejemplo de características morfológicas y culturales empleadas en la caracterización de 109 cepas de *Fusarium* aisladas a partir de 248 siembras provenientes de 40 plantaciones comerciales y 72 muestras de suelo y raíz de agave azul. Macroconidios (A-D): A-B, Rectos ligeramente curvos (48.8 y 44.62  $\mu\text{m}$ ), de 3 a 6 septos, célula apical redondeada y célula basal con apenas muescas. C, Largo con una ligera curvatura dorso ventral (76.45  $\mu\text{m}$ ), de 6 septas, célula apical afilada y célula basal apenas con muescas. D, Curvado con tres septas (32.68  $\mu\text{m}$ ), célula apical corta, célula basal con muescas distintivas. Microconidios (E-F): E, Ovalados sin septas. F, Ovalados con una septa. Monofiálides (G-J): G-H, Cortas (23.43  $\mu\text{m}$ ). I-J, Largas (147.91  $\mu\text{m}$ ). Clamidosporas (K): En cadena. Coloración micelial en Komada (L-P): L, Blanco. M, Morado. N, Rosa. O, Melón. P, Salmón.

**Figure 1.** Example of morphological and cultural characteristics used in the characterization of 109 *Fusarium* isolates obtained from 248 sowings from 40 commercial plantations and 72 samples of soil and blue agave root. Macroconidia (A-D): A-B, slightly curved straight (48.8 and 44.62  $\mu\text{m}$ ), 3 to 6 septa, rounded apical cell and basal cell with barely notches. C, Long with a slight curvature of the ventral dorsum (76.45  $\mu\text{m}$ ), of 6 septa, sharp apical cell and basal cell barely notched. D, Curved with three septa (32.68  $\mu\text{m}$ ), short apical cell, basal cell with distinctive notches. Microconidia (E-F): E, Oval without septa. F, Oval with a septa. Monophialides (G-J): G-H, Short (23.43  $\mu\text{m}$ ). I-J, Long (147.91  $\mu\text{m}$ ). Clamidospores (K): In chain. Mycelial coloration in Komada (L-P): L, White. M, Purple. N, Pink. O, 'Melon'. P, 'Salmon'.

B presentaron un septo. En general, los microconidios tuvieron una longitud media de 10  $\mu\text{m}$  y rango de 3.7-12.4  $\mu\text{m}$  (Figura 1 E-F). El tamaño de fiálides fue determinante para diferenciar entre cepas del grupo A y B. En el primer caso se observaron fiálides cortas con longitud media de 23.43  $\mu\text{m}$  (Figura 1 G-H) contra fiálides largos de 147.91  $\mu\text{m}$  en promedio del grupo B (Figura 1I-J). Las clamidosporas fueron escasas en la mayoría de cepas; sin embargo, algunos aislados de ambos grupos, las formaron individualmente o en cadena (Figura 1K). Las características morfológicas encontradas y su variabilidad concordaron con la descripción taxonómica del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Las 109 cepas se entregaron en resguardo a SENASICA-DGSV-CNRF. Aislados seleccionados para registro en el banco de genes de NCBI fueron: A115a=MH172303; A129a=MH179126.

En Komada, las cepas mostraron diferencias en textura micelial con predominancia lisa y algodonosa. Por colorimetría se diferenciaron diez colores sobresaliendo blanco, morado, rosáceo, salmón y melón (Figura 1L-P). En 57 aislados de raíz, provenientes de ocho municipios, se determinaron seis colores con mayor frecuencia de micelio blanco en 19/57 aislados (33.3%), principalmente en plantaciones con marchitez (Figura 2 A), seguido de aislados rosáceos. En 52 aislados de suelo de 11 municipios se tuvo toda la gama de colores con dominancia del morado en 14/52 aislados (26.92%) en las cuatro condiciones fitosanitarias (Figura 2 C; Cuadro 1 y 3), pero asociado principalmente a plantaciones con pudrición seca del cogollo (Figura 2B). El blanco fue el segundo color observado (Figura 1L-P; Figura 2C). En Arandas se obtuvo la mayor diversidad de color micelial para aislados de suelo y raíz seguido de Jesús María con abundancia de salmón, morado y blanco. En Tepatitlán sobresalió la combinación morado-rosácea para aislados de suelo en plantaciones improductivas y con

soil isolates from 11 counties, the entire range of colors with purple dominance was observed in 14/52 isolates (26.92%) in the four phytosanitary conditions (Figure 2C; Table 1 and 3), but mainly associated with dry bud rot plantations (Figure 2B). White was the second color observed (Figure 1L-P; Figure 2C). In Arandas, the greatest diversity of mycelial color was obtained for soil and root isolates, followed by Jesús María with abundance of 'salmon', purple and white. In Tepatitlán, the purple-pink combination for soil isolates in unproductive plantations and with dry bud rot stood out. In Jesús María, soil isolates from apparently healthy plantations were distinguished by white and purple mycelia (Figure 2C).

**Molecular identification and phylogeny.** From 25 strains selected for molecular analysis, optimal fragments of 550 bp ITS and 760 bp *EF-1a* were obtained (Figure 3). The use of STIs allowed the identification of strains at a genus level, but not at a species level because the sequence alignment between members of a species complex or between closely related species was not reliable. The partial sequence analysis of the *EF-1a* gene along with morphological characterization determined five *Fusarium* species (two of which unidentified) associated with wilting and dry bud rot, isolated from root and soil, which corresponded to three complexes of species of *Fusarium*: *F. oxysporum* of the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC), with 9 haplotypes, represented morphological group A; *F. solani*, *F. falciforme* and *Fusarium* sp. of the *Fusarium solani* (FSSC) species complex, with 2, 2 and 1 haplotype, respectively, of morphological group B; and *Fusarium* sp. of the *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) with a haplotype. The percentage of coverage and identity for species identification was 98-100%, with an E-value = 0. Representative sequences of the two main complexes, FOSC and

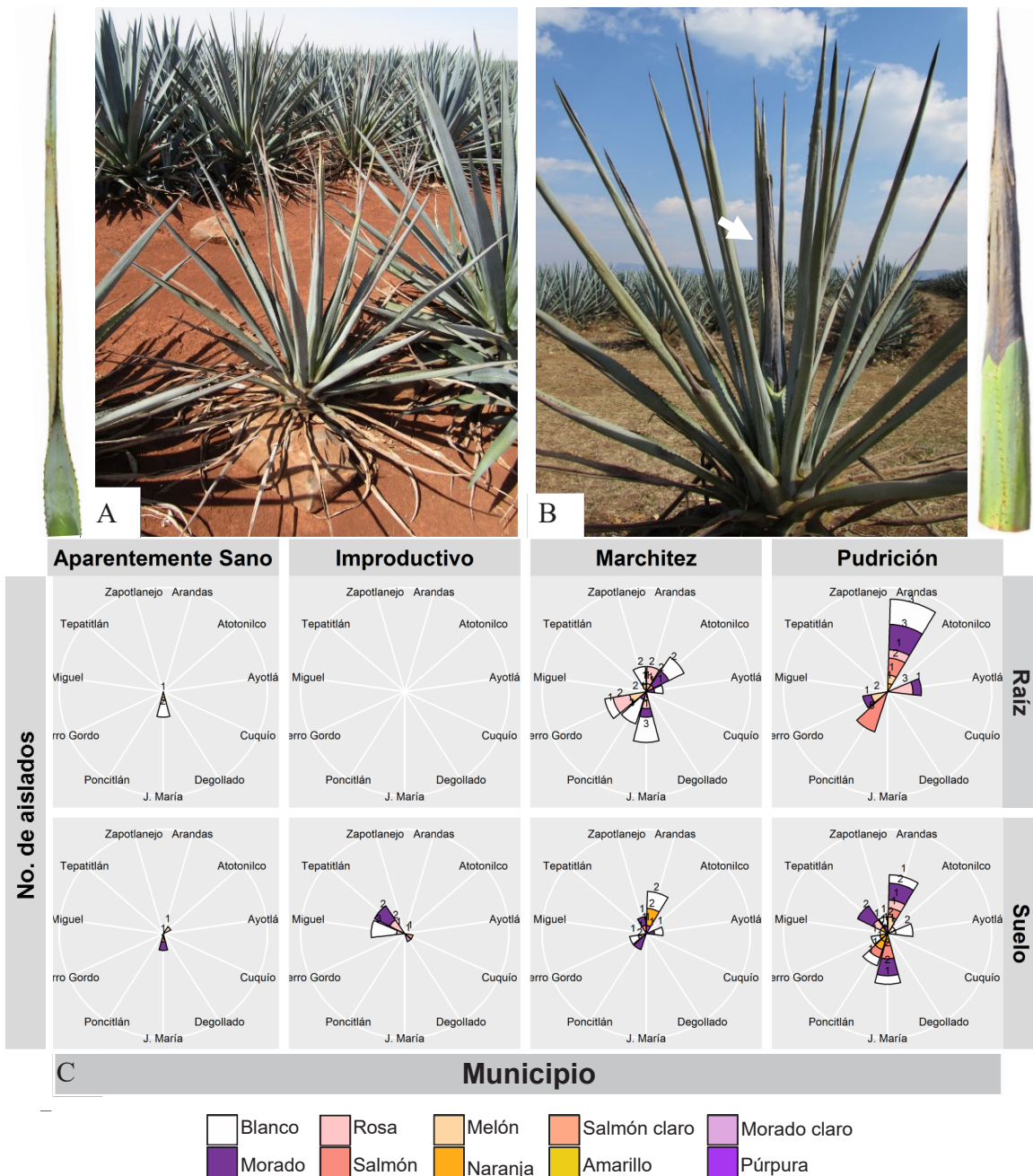


Figura 2. Plantas enfermas de focos seleccionados para muestreo. A) Planta con síntomas de marchitez severidad clase 4. Costado izquierdo, hoja con enrollamiento y deshidratación severa. B) Planta con síntomas de pudrición seca del cogollo severidad clase 5. Cogollo completo con secamiento avanzado (flecha). Costado derecho, cogollo con pudrición descendente y textura seca rígida. C) Diversidad de color micelial de 109 cepas de *Fusarium* spp. caracterizados en medio Komada, provenientes de 72 muestras de suelo y raíz de 40 plantaciones comerciales y 13 municipios de Los Altos, Jalisco. Verano 2016.

Figure 2. Diseased plants of selected foci for sampling. A) Plant with symptoms of wilt, severity class 4. Left side, leaf with curl and severe dehydration. B) Plant with symptoms of dry bud rot, severity class 5. Complete bud with advanced drying (arrow). Right side, bud with descending rot and rigid dry texture. C) Diversity of mycelial color of 109 isolates of *Fusarium* spp. characterized in Komada, obtained from 72 soil and root samples of 40 commercial plantations and 13 counties at Los Altos, Jalisco. Summer 2016.

podrición seca. En Jesús María, aislados de suelo en plantaciones aparentemente sanas se distinguieron por micelio blanco y morado (Figura 2C).

**Identificación molecular y filogenia.** A partir de 25 cepas seleccionadas para análisis molecular se obtuvieron fragmentos óptimos de 550 pb ITS y 760 pb EF-1a (Figura 3). El uso de ITS permitió la identificación de cepas a nivel género, pero no a especie, debido a que la alineación de secuencias entre miembros de un complejo de especies o entre especies estrechamente relacionadas no fue confiable. El análisis de secuencias parciales del gen EF-1a, aunado a la caracterización morfológica, determinó cinco especies de *Fusarium*, dos sin identificar, asociadas a marchitez y pudrición seca del cogollo, aislados de raíz y suelo, que correspondieron a tres complejos de especies de *Fusarium*: *F. oxysporum* del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC), con 9 haplotipos, representó al grupo morfológico A; *F. solani*, *F. falciforme* y *Fusarium* sp. del complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC), con 2, 2 y 1 haplotipo, respectivamente, del grupo morfológico B; y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) con un haplotipo. El porcentaje de cobertura e identidad para identificación de especies fue de 98-100%, con un E-value = 0. Secuencias representativas de los dos complejos principales, FOSC y FSSC, fueron registradas en Genbank con número de accesión MH172303 y MH179126, respectivamente (Cuadro 3). El análisis filogenético con base en el gen EF-1a confirmó la identificación taxonómica de cepas y mostró claramente el nivel de variabilidad y agrupación por complejos de especies con soporte estadístico de 73-100%. Las cepas de FSSC, a excepción del A185s, se agruparon con secuencias de referencia. En FOSC, únicamente 3/14, aislados se agruparon con secuencias de referencia, el resto se agrupó en clados distintos y asociados a valores de confiabilidad bajos (Figura 3), lo cual

FSSC, were registered in Genbank with accession number MH172303 and MH179126, respectively (Table 3).

The phylogenetic analysis based on the *EF-1a* gene confirmed the taxonomic identification of strains and clearly showed the level of variability and association by species complexes with statistical support of 73-100%. The FSSC strains with the exception of the A185s were grouped with reference sequences. In FOSC only 3 out of 14 isolates were grouped with reference sequences, whereas the rest were grouped into different clades and associated with low reliability values (Figure 3), which suggests greater genetic variation and adaptation of *F. oxysporum* to regional diversity of the agave production system. The only FFSC isolate, both in GenBank and phylogenetically, was grouped next to *F. andiyazi* but without corresponding to this species (Figure 3).

**Prevalence and symptomatic association.** The *F. oxysporum* (FOSC) complex was the most prevalent with 6/13 (46.15%) soil strains and 8/12 (66.66%) root stains, mainly associated with wilting. The *Fusarium solani* complex (FSSC) was the second in regional importance with *F. falciforme* 5/13 (38.46%) strains isolated only from soil, *F. solani* in 1/13 (7.9%) and 3/12 (25%) strains of soil and root, respectively, and with a strain denoted as *Fusarium* sp., isolated from the root 1/12 (8.33%). The strains of this complex were associated in the same proportion to plantations with wilting and dry bud rot. Two strains were associated with unproductive sites. *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) *Fusarium* sp., which was isolated from the root was associated with wilting symptoms (Figure 4). At the level of haplotypes by species, i.e. intraspecific sequence variants, *F. oxysporum* had six haplotypes associated solely with wilting, two with dry rot and one to both types of symptoms; *F. solani* had one associated exclusively to wilt and another



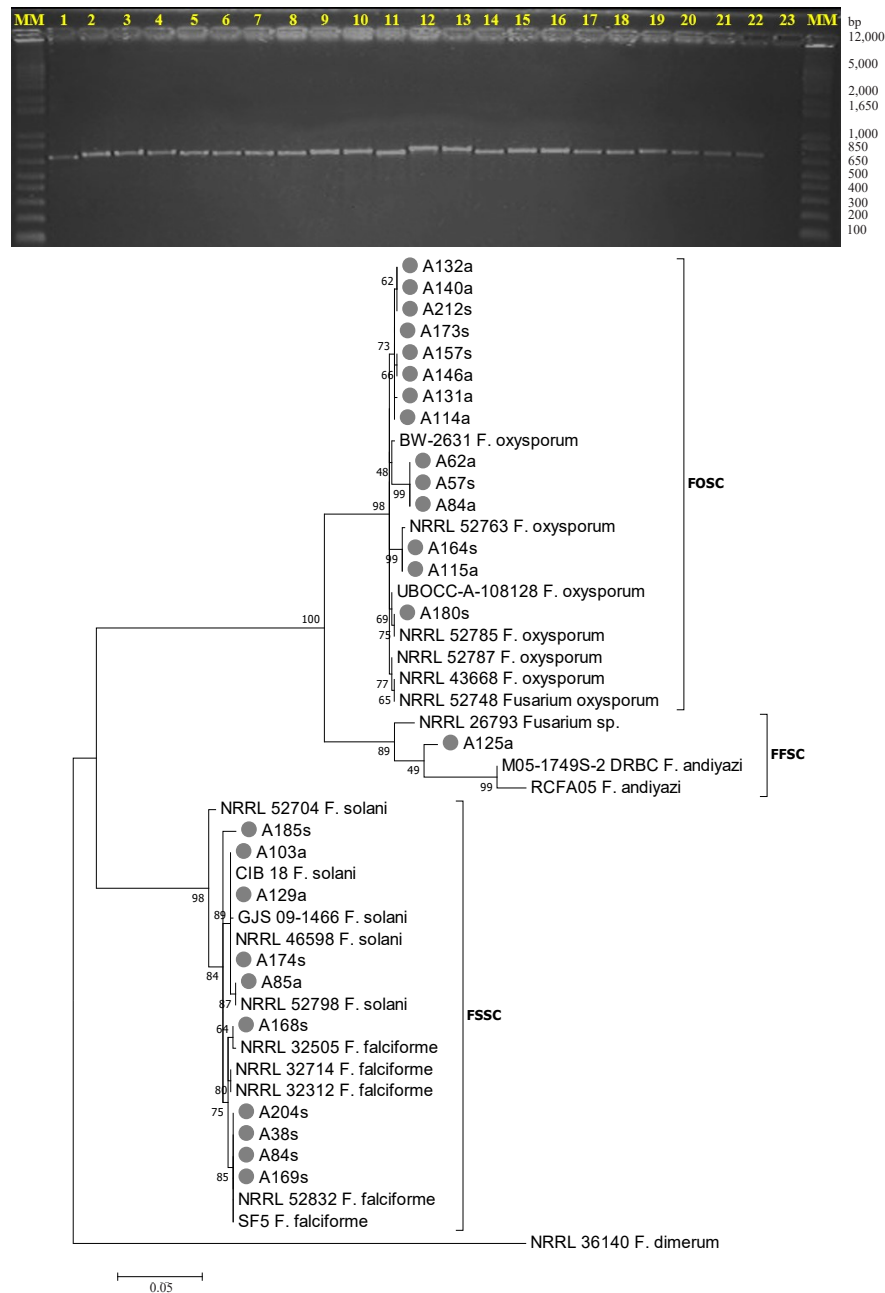


Figura 3. Imagen superior: Ejemplo de amplificación de productos PCR con gen EF-1a (760 pb). Carriles 1-21: ADN de *Fusarium* spp. 21: *F. oxysporum* (control), 23: Blanco con H<sub>2</sub>O. MM: Marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen. Inferior: Filogenia de 25 cepas de *Fusarium* spp. de suelo y raíz de *A. tequilana* (marcados con ●) basada en el gen EF-1a, mediante Máxima verosimilitud (ML) y Kimura-2 parámetros +G con 1000 repeticiones Bootstrap. Claves texto y numeral son secuencias de referencia del GenBank.

Figure 3. Top image: Example of amplification of PCR products with EF-1a gene (760 bp). Lanes 1-21: *Fusarium* spp. DNA 21: *F. oxysporum* (control), 23: White with H<sub>2</sub>O. MM: 1kb plus Invitrogen molecular weight marker. Bottom: Phylogeny of 25 isolates of *Fusarium* spp. of soil and root of *A. tequilana* (marked with ●) based on the EF-1a gene, using Maximum likelihood (ML) and Kimura-2 parameters +G with 1000 Bootstrap repetitions. Text and numeral keys are GenBank reference sequences.

**Cuadro 3. Fuente de aislamiento e identificación molecular, con base en la secuencia parcial del gen EF-1a, de 25 cepas de *Fusarium* spp. seleccionadas de un acervo de 109 cepas aisladas de suelo y raíz en cuatro condiciones fitosanitarias y previamente caracterizadas morfológica y culturalmente.**

**Table 3. Source of isolation and molecular identification, based on the partial sequence of the EF-1a gene, of 25 strains of *Fusarium* spp. selected from a collection of 109 isolates obtained from soil and root in four phytosanitary conditions and previously characterized morphologically and culturally.**

| Fuente de Aislamiento      | Especie/Complejo <sup>x</sup> | Condición Fitosanitaria     | ID aislado                 | Cobertura <sup>y</sup> % | Identidad <sup>y</sup> % | Secuencia Referencia |          |          |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|----------|----------|
| Suelo                      | <i>F. oxysporum</i> [FOSC]    | Marchitez                   | A173s                      | 100                      | 99                       | KP964900             |          |          |
|                            |                               |                             | A157s                      | 100                      | 99                       | JF740855             |          |          |
|                            |                               |                             | A164s                      | 100                      | 99                       | JF740837             |          |          |
|                            |                               | A57s                        | 100                        | 98                       | JF740855                 |                      |          |          |
|                            |                               | Pudrición                   | A180s                      | 100                      | 100                      | JF740853             |          |          |
|                            | A212s                         |                             | 100                        | 99                       | JF740855                 |                      |          |          |
|                            | <i>F. solani</i> [FSSC]       | Pudrición                   | A174s                      | 100                      | 99                       | JF740846             |          |          |
|                            |                               |                             | <i>Fusarium</i> sp. [FSSC] | A185s                    | 100                      | 100                  | -        |          |
|                            | Improductivo                  | <i>F. falciforme</i> [FSSC] | A38s                       | 100                      | 99                       | GU170631             |          |          |
|                            |                               |                             | A84s                       | 100                      | 99                       | GU170631             |          |          |
|                            |                               |                             | A169s                      | 100                      | 99                       | GU170631             |          |          |
|                            |                               |                             | A168s                      | 100                      | 99                       | GU170631             |          |          |
|                            |                               |                             | A204s                      | 100                      | 99                       | GU170631             |          |          |
|                            | Raíz                          | <i>F. oxysporum</i> [FOSC]  | Marchitez                  | A. sano                  | A132a                    | 100                  | 99       | JF740855 |
|                            |                               |                             |                            | A114a                    | 100                      | 99                   | JF740855 |          |
| A84a                       |                               |                             |                            | 100                      | 98                       | JF740855             |          |          |
| A115a <sup>z</sup>         |                               |                             |                            | 100                      | 99                       | JF740837             |          |          |
| A131a                      |                               |                             |                            | 100                      | 98                       | JF740855             |          |          |
| Pudrición                  |                               | A140a                       | 100                        | 99                       | JF740855                 |                      |          |          |
|                            |                               | A62a                        | 100                        | 98                       | JF740855                 |                      |          |          |
|                            |                               | A146a                       | 100                        | 98                       | JF740855                 |                      |          |          |
|                            |                               | A103a                       | 100                        | 98                       | JF740846                 |                      |          |          |
|                            |                               | A85a                        | 100                        | 99                       | EF452941                 |                      |          |          |
| <i>F. solani</i> [FSSC]    | Pudrición                     | A129a <sup>z</sup>          | 100                        | 99                       | EF452945                 |                      |          |          |
| <i>Fusarium</i> sp. [FFSC] | Marchitez                     | A125a                       | 100                        | 100                      | -                        |                      |          |          |

<sup>x</sup>Identificación taxonómica de aislados de suelo y raíz a nivel de género, especie y complejo mediante caracterización morfológica y molecular con EF-1a / Taxonomic identification of soil and root isolates at the genera level, species and species complex through morphological and molecular characterization with EF-1a.

<sup>y</sup>Cobertura % = Valor de cobertura en porcentaje determinado por nBLAST de NCBI usado en la identificación de cada aislado; Identidad % = Valor de identidad en porcentaje determinado por nBLAST de NCBI / Coverage% = Coverage value in percentage determined by NCBL nBLAST used in the identification of each isolate; Identity% = Identity value in percentage determined by NCBL nBLAST.

<sup>z</sup>Aislados seleccionados para registró en el banco de genes de NCBI: A115a=MH172303; A129a=MH179126 / Isolated selected for registration in the NCBI gene bank: A115a = MH172303; A129a = MH179126.

sugiere mayor variación genética y adaptación de *F. oxysporum* a la diversidad regional del sistema productivo agave. El único aislado del FFSC, tanto en GenBank como filogenéticamente, se agrupó próximo a *F. andiyazi* pero sin corresponder a esta especie (Figura 3).

that shared both. *F. falciforme*, although it had a specific haplotype associated with wilting, another haplotype shared both types of symptoms and was found in unproductive soils. The two unidentified *Fusarium* species at a species level were associated with specific symptoms of wilting or dry rot. *F.*

**Prevalencia y asociación sintomatológica.** El complejo *F. oxysporum* (FOSC) fue el más prevalente con 6/13 (46.15%) cepas de suelo y 8/12 (66.66%) de raíz, principalmente asociado con marchitez. El complejo *Fusarium solani* (FSSC) fue el segundo en importancia regional con *F. falciforme* 5/13 (38.46%) cepas aisladas únicamente de suelo, *F. solani* en 1/13 (7.9%) y 3/12 (25%) cepas de suelo y raíz, respectivamente, y con una cepa denotada como *Fusarium* sp. aislada de raíz 1/12 (8.33%). Las cepas de este complejo se encontraron asociadas en la misma proporción en plantaciones con marchitez y pudrición seca del cogollo. Dos cepas se asociaron a sitios improductivos. Del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium* sp. aislado de raíz, se asoció con síntomas de marchitez (Figura 4). A nivel de haplotipos por especie, i.e. variantes de secuencia intraespecíficos, *F. oxysporum* tuvo seis haplotipos asociados únicamente a marchitez, dos a pudrición seca y uno común a ambos tipos de síntomas; *F. solani* tuvo uno exclusivo a marchitez y otro común. *F. falciforme*, aunque tuvo un haplotipo específico a marchitez, otro haplotipo fue común y además se encontró en suelos improductivos. Las dos especies de *Fusarium* no identificadas a nivel de especie se asociaron con síntomas específicos de marchitez o pudrición seca. *F. oxysporum* tuvo en total cinco haplotipos repetidos. Cuatro asociados a diferentes municipios y síntomas lo cual fortalece la mayor condición prevalente de esta especie.

**Análisis regional del Índice de *Fusarium*.** El *IF* fue mayor en Atotonilco y Poncitlán con valores de 0.95 y 0.91, respectivamente, asociados a plantaciones con pudrición seca. Para marchitez, los municipios con mayor *IF* fueron San Ignacio C. G. y Ayotlán con valores de 0.48 y 0.45, respectivamente. Los *IF* más bajos (<0.25) se obtuvieron en Ayotlán, Arandas y Zapotlanejo asociados a

*oxysporum* had five repeated haplotypes. Four were associated to different counties and symptoms supporting the highest prevalence of this species.

**Regional analysis of the *Fusarium* Index.** *FI* was higher in Atotonilco and Poncitlán with values of 0.95 and 0.91 respectively. These values were associated with plantations with dry rot. In the case of wilting rot the counties with the highest *FI* were San Ignacio C. G. and Ayotlán with values of 0.48 and 0.45, respectively. The lowest *FIs* (<0.25) were obtained in Ayotlán, Arandas and Zapotlanejo in the case of dry rot, and in J. María, Poncitlán and Atotonilco for wilt (Figure 5A). In plantations with apparently asymptomatic agaves, *FI* was 0.49 and 0.42 for Atotonilco and J. María respectively, whereas in unproductive plots of Cuquío, Degollado and Tepatitlán, *FI* was within the range of 0.37–0.58. These results show the wide distribution of *Fusarium* and the epidemic risk it represents. Among the total fungi counted in soil samples some genus with antagonistic and suppressive capacity such as *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Bionectria* spp. and *Aspergillus* spp. were found.

*FI* had an inversely proportional relationship with soil pH and MO ( $p \leq 0.02$ ). The *FI* decremental rate with respect to the increase in pH was adequately estimated with the negative exponential model ( $b = 0.83$ ,  $r^2 = 0.71$ ,  $p < .0001$ ) and Gregory ( $b = 4.91$ ,  $r^2 = 0.72$ ,  $p = 0.0098$ ). With these models, it was estimated that  $\text{pH} \leq 5.5$  is inductive to *Fusarium* ( $FI \geq 0.33$ ). The highest *Fusarium* Index (0.92) was at a pH of 4.6 and the lowest (0.1) in neutral-alkaline soils (6.9–7.7) (Figure 5B). With respect to MO, the estimated rate was slightly better with the negative exponential model ( $b = 0.64$ ,  $r^2 = 0.68$ ,  $p < .0001$ ) than with Gregory ( $b = 1.98$ ,  $r^2 = 0.63$ ,  $p = 0.0238$ ). Similarly, it was estimated that  $\text{MO} \leq 2.5$  is inductive to *Fusarium* ( $FI \geq 0.30$ ). Thus,

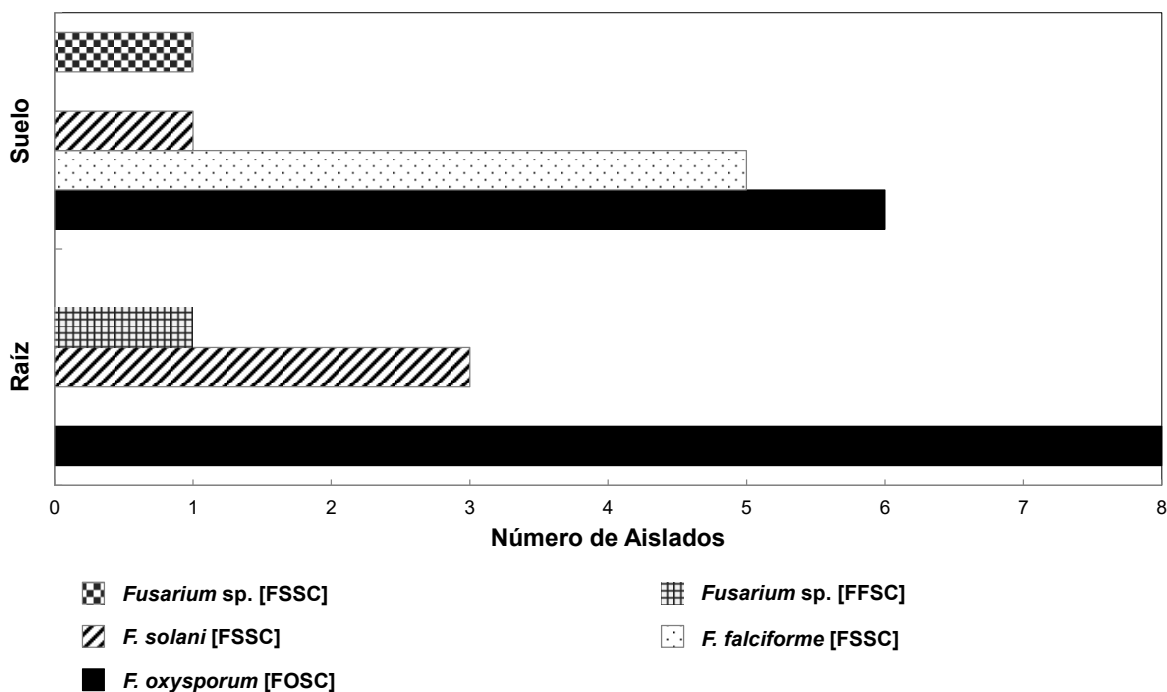


Figura 4. Frecuencia de especies/complejo en 25 cepas de *Fusarium* spp. seleccionadas de un acervo de 109 cepas aisladas de suelo y raíz en cuatro condiciones fitosanitarias y previamente caracterizadas morfológica y culturalmente. Verano, 2016. Los Altos, Jalisco.

Figure 4. Frequency of species / complex in 25 isolates of *Fusarium* spp. selected from a collection of 109 isolates obtained from soil and root in four phytosanitary conditions and previously characterized morphologically and culturally. Summer, 2016. Los Altos, Jalisco.

putrición seca, y en J. María, Poncitlán y Atotonilco para marchitez (Figura 5 A). En plantaciones con agaves aparentemente asintomáticos, *IF* fue 0.49 y 0.42 para Atotonilco y J. María, respectivamente; mientras que en parcelas improductivas de Cuquío, Degollado y Tepatitlán, *IF* estuvo en el rango 0.37-0.58. Estos resultados muestran la amplia distribución de *Fusarium* y el riesgo epidémico que representa. Entre los hongos totales contabilizados en muestras de suelo se encontraron géneros con capacidad antagonista y supresiva como *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Bionectria* spp. y *Aspergillus* spp.

lower *FI* values  $\leq 0.2$  were associated with MO 3.3-5.4 (Figure 5C). Comparing contrasting counties: in Atotonilco, a plantation with a value of *FI*=0.95 was associated with dry rot and pH=6.18 and MO=3.16; whereas another plantation associated with wilting had that of *FI*=0.21 with pH=6.95 and MO=5.36. In J. María, a plantation associated with dry rot with a value of *FI*=0.51 was related to pH=5.57 and MO=2.34, and another one associated to wilt had one of *IF*=0.11 pH=6.57 and MO=2.48. This suggests that, although *FI* may be determined by other edaphic-biological factors, it is possible to establish pH:MO thresholds suppressive to *Fusarium* (Figure 6).

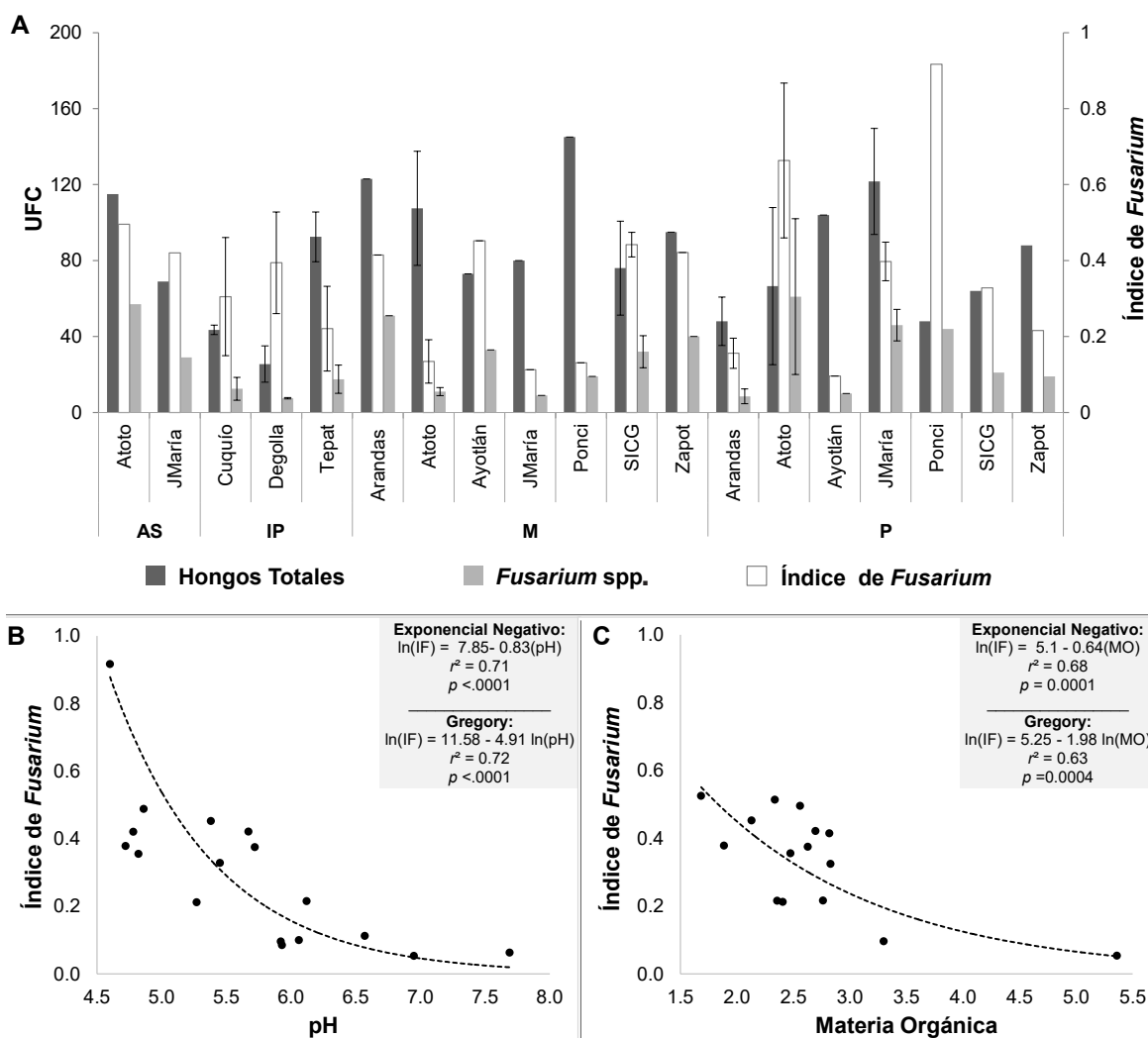


Figura 5. A) Unidades Formadoras de Colonias (UFC) e Índice de *Fusarium* obtenidas de 28 plantaciones comerciales de agave azul en cuatro condiciones fitosanitarias de 11 municipios de Los Altos, Jalisco. Barras de error indican desviación estándar. Ausencia de barras indican una muestra por municipio (Cuadro 1). Condición sanitaria: AS= Aparentemente sano, IP = Improductivo, M = Marchitez y P = Pudrición. B-C) Ajuste de nivel máximo de índice de *Fusarium* a modelos Exponencial Negativo y Gregory con respecto a pH del suelo (B) y Materia orgánica (C). Verano 2016. Los Altos, Jalisco.

Figure 5. A) Colony Forming Units (UFC) and *Fusarium* Index obtained from 28 commercial blue agave plantations in four phytosanitary conditions in 11 counties at Los Altos, Jalisco. Error bars indicate standard deviation. Absence of bars indicate a single sample per county (Table 1). Health condition: AS = Apparently healthy, IP = Unproductive, M = Wilt and P = Dry bud rot. B-C) Goodness-of-fit of *Fusarium* index maximum level to Exponential Negative and Gregory models with respect to soil pH (B) and Organic matter (C). Summer 2016. Los Altos, Jalisco.

*IF* tuvo una relación inversamente proporcional con pH de suelo y MO ( $p \leq 0.02$ ). La tasa decremental de *IF* respecto al aumento de PH se estimó adecuadamente con el modelo exponencial negativo ( $b=0.83$ ,  $r^2=0.71$ ,  $p < 0.0001$ ) y Gregory ( $b=4.91$ ,  $r^2=0.72$ ,  $p=0.0098$ ). Con estos modelos se estimó que  $pH \leq 5.5$  es inductivo a *Fusarium* ( $IF \geq 0.33$ ). El Índice de *Fusarium* más alto (0.92) se tuvo a un pH de 4.6 y el menor (0.1) en suelos neutro-alcalinos (6.9-7.7) (Figura 5B). Con respecto a MO, la tasa estimada fue ligeramente mejor con el modelo exponencial negativo ( $b=0.64$ ,  $r^2=0.68$ ,  $p < 0.0001$ ) que con Gregory ( $b=1.98$ ,  $r^2=0.63$ ,  $p=0.0238$ ). Similarmente, se estimó que  $MO \leq 2.5$  es inductivo a *Fusarium* ( $IF \geq 0.30$ ). Así, los valores más bajos de  $IF \leq 0.2$  se asociaron con MO 3.3 - 5.4 (Figura 5C). Comparando municipios contrastantes, en Atotonilco, una plantación con  $IF=0.95$  estuvo asociada a pudrición seca con  $pH=6.18$  y  $MO=3.16$ ; mientras otra plantación asociada a marchitez tuvo  $IF=0.21$  con  $pH=6.95$  y  $MO=5.36$ . En J. María, una plantación asociada a pudrición seca con  $IF=0.51$  estuvo relacionada con  $pH=5.57$  y  $MO=2.34$ , y otra asociada a marchitez con  $IF=0.11$   $pH=6.57$  y  $MO=2.48$ . Lo anterior sugiere que, aunque *IF* puede estar determinado por otros factores edáfico-biológicos, es posible establecer umbrales pH:MO supresivos a *Fusarium* (Figura 6).

## DISCUSIÓN

La marchitez y pudrición seca del cogollo constituyen problemas fitosanitarios de alto riesgo productivo del agave azul (*Agave tequilana*) en la región DOT. El manejo fitosanitario de estas enfermedades actualmente es limitado en gran parte por restricciones etiológicas y epidemiológicas (Rubio, 2007; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). En trabajos previos, la metodología etiológica ha sido regionalmente delimitada o se han enfatizado métodos

## DISCUSSION

The wilt and dry bud rot constitute phytosanitary problems of high productivity risk in blue agave (*Agave tequilana*) in the DOT region. The phytosanitary management of these diseases is largely limited by etiological and epidemiological restrictions (Rubio, 2007; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). In previous studies, the etiological approach has been regionally restricted or morphological and classical molecular methods based on ITSs have been emphasized with partial results (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). This is the first comprehensive regional work that involves epidemiological inductivity approaches in the selection of 40 commercial plantations in stages of productive stress of 3-4 years. The research included 11 counties at Los Altos, the main agave producing region of Jalisco with historical background of high epidemic intensity on these diseases (Acevedo-Sanchez *et al.*, 2017). Additionally, this work differentiated soil and root samples obtained at the focus and peripheral level from four predominant phytosanitary conditions: wilting, dry rot, seemingly healthy plantations and unproductive plots. The objective was to maximize and minimize regional and intra-plot variability, respectively, in the morphological, cultural and molecular characterization of *Fusarium* isolates associated to the agave. The conception of this approach considers previous evidence of the implication of *F. oxysporum* and *F. solani* on wilting (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017) and *Fusarium* sp. on dry bud rot (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011) and was conceived assuming implication of a *Fusarium* species complex with contrasting interspecific parasitic fitness both, at regional and symptom level. This work demonstrated the association of five species with symptoms of wilting and / or dry rot located

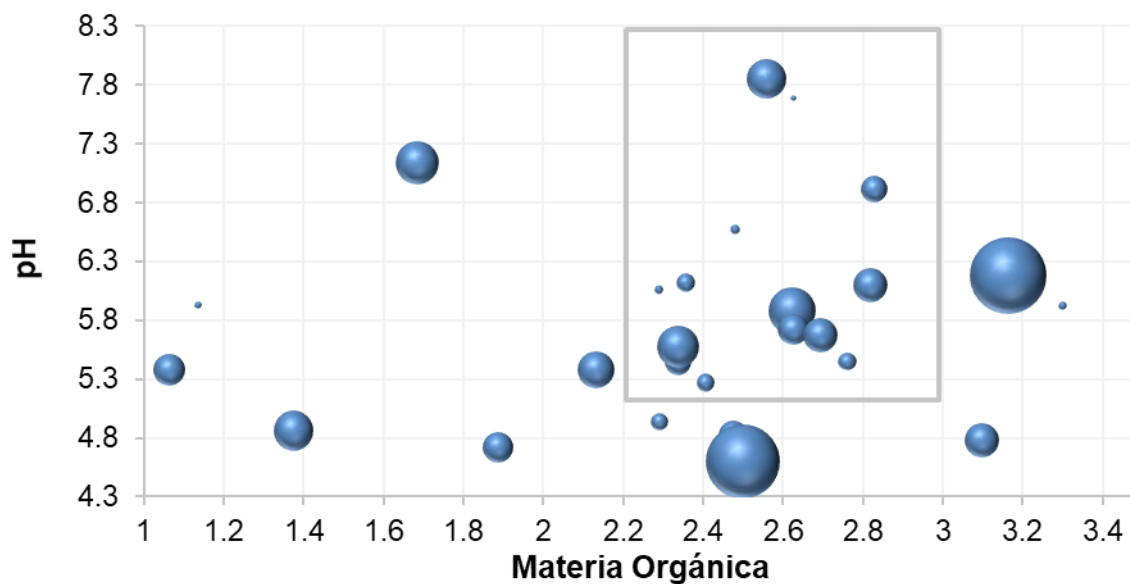


Figura 6. Relación de pH y MO en función al Índice de *Fusarium*. El recuadro muestra potencial umbral pH:MO asociado a bajos niveles de *IF*. El tamaño del círculo es proporcional al valor de *IF*. Verano 2016. Los Altos, Jalisco.

Figure 6. Relationship of pH and MO in function to *Fusarium* Index. The box shows a potential pH: MO threshold associated with low levels of *IF*. The size of the circle is proportional to the value of *IF*. Summer 2016. Los Altos, Jalisco.

morfológicos y moleculares clásicos basados en ITS con parciales resultados (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). Este es el primer trabajo exhaustivo regional que involucra el enfoque de inductividad epidemiológica en la selección de 40 plantaciones comerciales en edades de estrés productivo de 3-4 años. La investigación incluyó 13 municipios de Los Altos, principal región agavera de Jalisco, con antecedentes históricos de alta intensidad epidémica a estas enfermedades (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017). Adicionalmente, este trabajo diferenció muestras de suelo y raíz obtenidas a nivel de foco y perifoco provenientes de cuatro condiciones fitosanitarias predominantes: marchitez, pudrición seca del cogollo, plantaciones aparentemente sanas y parcelas improductivas. El objetivo fue maximizar y minimizar la variabilidad regional e intraparcularia, respectivamente, en la caracterización morfológica,

in three phylogenetic complexes: *F. oxysporum* of the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) with 56% regional representativeness (46.2% soil y 66.7% root); *F. solani*, *F. falciforme* and *Fusarium* sp. of the *Fusarium solani* (FSSC) complex (40%); and *Fusarium* sp. of the *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) (4%). For the first time, the association of *F. falciforme* is reported, which was the only species associated to plantations with wilting, dry bud rot and unproductive condition, and two species still unidentified, one of them belonging to a complex without previously reported species in agave (FFSC). Root and soil isolates allowed analyze the results consistence due to the fungus association directly with host tissue. *F. falciforme* and *Fusarium* sp. (FSSC) were the only ones isolated only from soil. However, the former has already been found in aerial agave tissue in other Jalisco regions (CP-LANREF. Unpublished data).

cultural y molecular de *Fusarium* spp. asociados al agave. La concepción de este enfoque considera evidencias previas de la implicación de *F. oxysporum* y *F. solani* en marchitez (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017) y de *Fusarium* sp. en pudrición seca (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011) y se planteó asumiendo la asociación de un complejo de *Fusarium* spp. con adaptabilidad parasítica interespecífica, regional y sintomatológica, contrastante. Este trabajo demostró la asociación de cinco especies con síntomas de marchitez y/o pudrición seca ubicadas en tres complejos filogenéticos: *F. oxysporum* del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC) con 56% de representatividad regional (46.2% suelo y 66.7% raíz); *F. solani*, *F. falciforme* y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium solani* (FSSC) (40%); y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (4%). Por primera vez se reporta la asociación de *F. falciforme*, única especie vinculada a plantaciones con marchitez, pudrición seca e improductivas, y dos especies aún sin identificar, una de ellas perteneciente a un complejo sin especies previamente reportadas en agave (FFSC).

Aislamientos de raíz y suelo permitieron analizar la consistencia de resultados al asociar al hongo directamente con tejido del hospedante. *F. falciforme* y *Fusarium* sp. (FSSC) fueron los únicos que se aislaron exclusivamente de suelo. Sin embargo, el primero se ha encontrado en tejido aéreo de agave en otras regiones de Jalisco (CP-LANREF. Datos no publicados). El análisis de secuencias y filogenia confirmó la variabilidad intra e interespecífica de *Fusarium* y la asociación de haplotipos, referidos aquí como variantes de secuencia intra-específicas con base en el gen EF-1a, con síntomas específicos. Claramente, marchitez se asoció con más haplotipos específicos a este síntoma pertenecientes a *F. solani*, *F. falciforme* y *F. oxysporum*. Este último fue la especie más diversa e incluyó

Sequence analysis and phylogeny confirmed the intra and interspecific variability of *Fusarium* and the association of haplotypes, referred to here as intra-specific sequence variants based on the *EF-1a* gene, with specific symptoms. Clearly, wilting was associated with more haplotypes specific to this symptom belonging to *F. solani*, *F. falciforme* and *F. oxysporum*. The later was more diverse and included the only haplotype associated exclusively to dry bud rot and the only one found in apparently healthy plantations. The existence of only one haplotype by complex associated only with dry bud rot or with the ability to cause both types of symptoms suggests an interspecific process of divergent evolution with adaptation to aerial symptoms, wilt being the parasitic condition associated to the ancestral specie(s). The occurrence of two unidentified species may involve advanced speciation or less likely, a convergent evolution process. The possibility of these population genetics processes is highly possible considering the continued and confined agave cultivation for more than 200 years and the agave semi-perennial condition with vegetative propagation. These adaptive mechanisms have been suggested in crops such as mango (*Mangifera indica*) given the increasing variability and occurrence of new *Fusarium* species (Liew *et al.*, 2016). In this context, it is concluded that the wilting and dry rot of the agave bud are symptomatic expressions of a syndrome caused by different *Fusarium* species with differential parasitic adaptability at the intra and interspecies level. One single isolate (haplotype) of *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. falciforme* can apparently cause wilt and dry bud rot but are not the most prevalent, which explain the low incidence of both symptoms at the same plant in the field. In total, these species have the highest numbers of isolates (haplotypes) specialized only to cause wilting, thus clarify the intense occurrence



el único haplotipo asociado exclusivamente a pudrición seca y el único encontrado en plantaciones aparentemente sanas. La existencia de un haplotipo, por complejo de especies, asociado únicamente con pudrición seca o con la capacidad de causar los dos tipos de síntomas sugiere un proceso interespecífico de evolución divergente con adaptación a síntomas aéreos, siendo marchitez la condición parasítica asociada a la especie(s) ancestral. La ocurrencia de dos especies no identificadas puede implicar procesos avanzados de especiación o la existencia, menos probable, de procesos de evolución convergente. La viabilidad de estos procesos genéticos poblacionales es posible considerando la continuada y confinada cultivación del agave por más de 200 años en región DOT y la condición semiperenne del cultivo con propagación vegetativa. Estos mecanismos adaptativos se han sugerido en cultivos como el mango (*Mangifera indica*) ante la creciente variabilidad y ocurrencia de nuevas especies de *Fusarium* (Liew *et al.*, 2016). Con este contexto, se concluye que la marchitez y la pudrición seca del cogollo del agave son expresiones sintomatológicas de un síndrome causado por diferentes especies de *Fusarium* con adaptabilidad parasítica diferencial a nivel intra e interespecie. La marchitez y pudrición seca puede ser causada por un mismo aislado (haplotipo) de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. falciforme* pero no son los más prevalentes, lo que explica la baja incidencia de ambos síntomas en la misma planta. Estas mismas especies tienen en conjunto un mayor número de aislados (haplotipos) especializados únicamente en marchitez siendo congruente con su alta intensidad epidémica regional. Esta conclusión requiere posteriores estudios de patogenicidad y epidemiología especializados, ampliar otras regiones agaveras DOT, muestreo de tejido aéreo, incluir mayor acervo de secuencias, y el empleo de otros genes como los asociados a RPB1 y RPB2 (O'Donnell *et al.*, 2015). Sin embargo, estos

and epidemic rates reported for this symptom (Rubio, 2007; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

These findings require further specialized epidemiological and pathogenicity studies, expanding other DOT agave regions, air tissue sampling, including more sequences, and the use of other genes such as those associated with *RPB1* and *RPB2* (O'Donnell *et al.*, 2015). However, these results contribute to the improvement of regional control and monitoring strategies by clarifying the etiology of the three types of bud rot (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014; Coria-Contreras *et al.*, 2019). To this respect, in this work and that conducted with grey spot at state level (Coria-Contreras *et al.*, 2019), the bacterial rot was never detected nor isolated from the field indicating a too low prevalence or occurrence only under specific agronomic and/or climatic condition (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014).

Regional etiological studies, in addition to an epidemiological approach (Ceja-Torres *et al.*, 2008), require methodological strategies to optimize time, economic resources and to provide a rational framework. This work shows the importance of combining morphological and classical cultural strategies with the current molecular approach (Leslie and Summerell, 2006; O'Donnell *et al.*, 2015; Gogoi *et al.*, 2017). The characterization of a total of 109 regional *Fusarium* isolates in five culture media allowed categorizing by groups and finally selecting the collection of representative strains for molecular identification (Burgess *et al.*, 1991; Leslie and Summerell, 2006). Previously determined as important for screening *Fusarium* isolates in PDA (Gogoi *et al.*, 2017), mycelial colorimetry was essential as an initial phase due to the large amount of initial cultures in Komada (248). On the other hand, due to the complexity of the etiological problem of this work, the ITS

resultados coadyuvan a mejorar estrategias de control y monitoreo regional al clarificar la etiología de los tres tipos de pudrición del cogollo (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014; Coria-Contreras *et al.*, 2019). Al respecto, en este trabajo y el realizado con mancha gris a nivel estatal (Coria-Contreras *et al.*, 2019), la pudrición bacteriana no fue detectada lo que supone su extremada baja prevalencia u ocurrencia en condiciones agronómicas y climáticas muy específicas (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014).

Estudios etiológicos regionales, además de un enfoque epidemiológico (Ceja-Torres *et al.*, 2008), requieren de estrategias metodológicas que permitan optimizar tiempo, recursos económicos y aportar a un marco racional de análisis. Este trabajo mostró la importancia de combinar estrategias morfológicas y culturales clásicas con el enfoque molecular actual (Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell *et al.*, 2015; Gogoi *et al.*, 2017). La caracterización de un total de 109 aislados regionales de *Fusarium*, en cinco medios de cultivo, permitió categorizar por grupos y finalmente seleccionar el acervo de cepas representativas para identificación molecular (Burgess *et al.*, 1991; Leslie y Summerell, 2006). La colorimetría micelial, importante atributo discriminante para *Fusarium* en PDA (Gogoi *et al.*, 2017), resultó fundamental como fase inicial debido al gran acervo de siembras iniciales en Komada (248). Por otro lado, debido a la complejidad del problema etiológico de este trabajo, la región ITS no fue funcional para la identificación de *Fusarium*. Vetrovsky y colaboradores (2016) indican que esta región no es adecuada por su alta variabilidad, su naturaleza multicopia y su longitud tan variable. Adicionalmente, ITS es una región altamente conservada para resolver límites interespecíficos de *Fusarium*. Por lo anterior, se estima que 50% de secuencias *Fusarium* o más, están incorrectamente

region was not functional for the identification of *Fusarium*. Vetrovsky and coworkers (2016) indicate that this region is not suitable due to its high variability, its multi-copy nature and its variable length. Additionally, ITS is a region highly conserved to resolve interspecific *Fusarium* boundaries. Therefore, it is estimated that 50% of *Fusarium* sequences or more are incorrectly identified at NCBI (O'Donnell *et al.*, 2015). These aspects are fundamental from the etiological and population genetic perspective due to the current relevance of *Fusarium*. In Mexico, recent studies show the importance of this genus in crops such as *Jatropha curcas*, *Capsicum pubescens* and *Citrus sinensis* (Herrera-Parra *et al.*, 2017; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2019; Parra-Cota *et al.*, 2019).

Although the *Fusarium* Index *IF* was highly variable between counties and plantation phytosanitary condition, *IF* is proposed as an indicator to relate fungus richness to *Fusarium* spp. to estimate soil suppressive condition under the assumption that sustainable management of *Fusarium*, a fungus with high saprophytic-parasitic capacity, should be based on prevention and promoting soil health. *IF* variability can be explained by its multifactorial determinant as evidenced by its inverse relationship with pH and MO ( $r^2 = 0.72 - 0.68$ ). The inductive effect of *Fusarium* populations due to acid pH has been reported in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Huang *et al.*, 2019) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. In this case, pH lower than 5.2 was more inductive (Fang *et al.*, 2012). Similarly, a MO rich soil (i.e. greater than 3%) is widely accepted as a condition of suppressive soils that favors competition or inhibition of *Fusarium* spp. due to beneficial microorganisms (Orr and Nelson, 2018; Huang *et al.*, 2019). In this investigation, *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. frequently were found associated to agave plantations with

identificadas en NCBI (O'Donnell *et al.*, 2015). Estos aspectos son fundamentales desde la perspectiva etiológica y genética poblacional debido a la relevancia actual de *Fusarium*. En México, recientes estudios demuestran la importancia de este género en cultivos como *Jatropha curcas*, *Capsicum pubescens* y *Citrus sinensis* (Herrera-Parra *et al.*, 2017; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2019; Parra-Cota *et al.*, 2019).

Aunque el Índice *Fusarium* (IF) fue altamente variable entre municipios y condición fitosanitaria de plantación, IF se propone como indicador para relacionar riqueza de hongos respecto a *Fusarium* spp. para estimar la condición supresiva del suelo bajo la premisa que el manejo sustentable de *Fusarium*, hongo con alta capacidad saprobiótica-parasítica, se debe basar en la prevención promoviendo la salud del suelo. La variabilidad IF puede explicarse por su determinante multifactorial como lo evidenció la relación inversamente proporcional con pH y MO ( $r^2 = 0.72 - 0.68$ ). El efecto inductivo de poblaciones de *Fusarium* con pH ácido se ha reportado en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Huang *et al.*, 2019) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. En este caso, pH menor a 5.2 fue más inductivo (Fang *et al.*, 2012). Similarmente, un suelo rico en MO (i.e. mayor a 3%) es una condición ampliamente aceptada de suelos supresivos que favorece poblaciones de microorganismos que compiten o inhiben el desarrollo de *Fusarium* spp. (Orr y Nelson, 2018; Huang *et al.*, 2019). En esta investigación, *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. frecuentemente se asociaron a plantaciones con bajo IF (CP-LANREF. Datos no publicados) lo que demuestra la necesidad de estudios integrales regionales. La propuesta de umbrales pH:MO en este trabajo tiene potencial para estimar riesgos productivos por *Fusarium* spp. en agave.

La diversidad, complejidad y prevalencia de especies de *Fusarium* en plantaciones comerciales

low IF (CP-LANREF. Unpublished data) which demonstrates the need for regional comprehensive studies. The pH:MO thresholds suggestion in this work has potential to estimate productive risks due to *Fusarium* spp. in agave.

The diversity, complexity and prevalence of *Fusarium* species in commercial plantations at Los Altos and the historical productive impacts caused by this fungus stimulate to investigate the wilt and dry bud rot syndrome with a comprehensive approach relating the pathosystem to physical-chemical soil variables, antagonists richness, climatic factors and crop management. This approach will allow effective preventive management strategies and sustaining soil health. Likewise, it will help to estimate and mitigate risks associated with *Fusarium* spp. due to the intense mobilization of vegetative planting material required for crop expansion upon demand on tequila exports, currently in fifth income place among Mexican agricultural commodities. Blue agave constitutes a valuable crop chain that justifies research and innovation investment to assure competitiveness and the socio-cultural and environmental preservation values.

## CONCLUSIONS

This research provides for the first time exhaustive etiological information associated with wilting and dry bud rot of blue agave (*A. tequilana*) in 40 commercial plantations of 11 counties at Los Altos Jalisco. Morphological, cultural and molecular characterization of *Fusarium* spp. isolates associated with these symptoms allows unifying them as expressions of a syndrome caused by five species of *Fusarium* belonging to *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) and *F. fujikuroi* (FFSC) complexes. It is proposed to name this disease as

de Los Altos y los impactos productivos históricos causados por este hongo estimula investigar el síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo desde una perspectiva sistémica, en la cual se considere el modelo planta-patógeno en relación a variables físico-químicas del suelo, riqueza biológica de antagonistas, factores climáticos y tipologías productivas. La comprensión sistémica permitirá desarrollar estrategias de manejo preventivas efectivas y sustentar la salud del suelo. Así mismo, coadyuvará a estimar y mitigar riesgos asociados a *Fusarium* spp. debido a la intensa movilización de hijuelos requerida por el incremento de superficie plantada ante la demanda de exportación de tequila, actualmente en quinto lugar en generación de divisas. El cultivo de agave azul constituye una cadena productiva que justifica inversión en investigación e innovación que garantice su rentabilidad y preservación socio-cultural y ambiental.

## CONCLUSIONES

Esta investigación aporta por primera vez información etiológica exhaustiva asociada a la marchitez y pudrición seca del cogollo de agave azul (*A. tequilana*) en 40 plantaciones comerciales de 13 municipios de Los Altos, Jalisco. La caracterización morfológica, cultural y molecular de aislados de *Fusarium* spp. asociados a estos síntomas permite unificarlos como expresiones de un síndrome causado por cinco especies de *Fusarium* pertenecientes a los complejos *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) y *F. fujikuroi* (FFSC). Se propone denominar *marchitez y pudrición seca del cogollo* del agave a esta enfermedad. La marchitez y pudrición seca puede ser causada por un mismo aislado (haplotipo) de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. falciforme* pero, contrario a los que causan únicamente marchitez, no fueron los más prevalentes. *F.*

*wilt and dry bud rot* of agave. Wilt and dry bud rot can be caused by a single isolate (haplotype) of *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. falciforme* but, contrary to those that cause only wilting, they were not the most prevalent. *F. oxysporum* was the most variable and prevalent in soil (46.2%) and root (66.7%) suggesting greater parasitic fitness. *F. falciforme* and two unidentified species belonging to FSSC and FFSC complexes are reported for the first time associated with agave. Although, these results require greater precision through epidemiological and pathogenicity studies, the extensive nature of this work confers clear etiological trends. The *Fusarium* Index *IF* has potential as indicator of fungal richness respect to *Fusarium* spp. to estimate soil suppressive condition. A significant inverse relationship of *IF* with pH and MO was found, allowing to suggest an integrated threshold to estimate productive risks due to *Fusarium*. Finally, considering the official campaign against agave pests, these results justify use of independent wilt and dry bud rot diagrammatic scales for monitoring purposes. However, the inclusion of algorithms in the SIVEA digital system is recommended to automatize analysis of the syndrome regional incidence for risk analysis purposes.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to CNRF-DGSV for the financial support through the SENASICA-CRT agreement for the execution of the SIVEA project. To COLPOS and CONACYT for the first author's master's degree scholarship. To Casa Herradura, Casa Sauza and CESAWEJAL for logistical support and/or infrastructure. To CP-LANREF team for its unconditional support in the development of this research. To Miranda Mora Gutiérrez for the English translation.

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

oxysporum fue el más variable y prevalente en suelo (46.2%) y raíz (66.7%) sugiriendo mayor adaptabilidad parasítica. *F. falciforme* y dos especies sin identificar de los complejos FSSC y FFSC se reportan por primera vez asociados al agave. Aunque, estos resultados requieren mayor precisión mediante estudios epidemiológicos y de patogenicidad, el carácter extensivo de este trabajo confiere claras tendencias etiológicas. El Índice *Fusarium* (*IF*) tiene potencial como indicador de riqueza de hongos respecto a *Fusarium* spp. para estimar la condición supresiva del suelo. *IF* tuvo una relación significativa inversamente proporcional con pH y MO, lo que permite proponer umbrales integrados para estimar riesgos productivos por *Fusarium*. Finalmente, considerando la campaña oficial contra plagas del agave, estos resultados justifican el empleo de escalas diagramáticas independientes para marchitez y pudrición seca del cogollo con fines de monitoreo. Sin embargo, se recomienda la inclusión de algoritmos en el sistema digital SIVEA para automatizar el análisis la incidencia regional del síndrome por tipología de síntoma con propósito de análisis de riesgo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CNRF-DGSV por el apoyo financiero a través de convenio SENASICA-CRT para ejecución del proyecto SIVEA. Al COLPOS y CONACYT por la beca de maestría del primer autor. A Casa Herradura, Casa Sauza y CESAVEJAL por el apoyo logístico y/o infraestructura. Al equipo LANREF por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación. A Miranda Mora Gutiérrez por la traducción al inglés.

LITERATURA CITADA

- Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, López-Bautista V, Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras J, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, y Mora-Aguilera G. 2017. Criterios epidemiológicos para implementar una red de monitoreo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. en regiones agaveras de Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 176-177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Almaraz-Sánchez A, Ayala-Escobar V, Tlatilpa-Santamaría IF y Nieto-Angel D. 2018. *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 159-169. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-2>
- Ávila-Miranda ME, López-Zazueta JG, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola MA, Guzmán-de Peña DA, Vera-Núñez JA and Peña-Cabriales J.J. 2010. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 12: 166-180. <https://pdfs.semanticscholar.org/b624/2327d0c870be2105ebda216325f241da3a7c.pdf>
- Burgess LW, Summerell BA and Nelson PE. 1991. An evaluation of several media for use in identification of some *Fusarium* spp. *Australasian Plant Pathology* 20: 86-88. <https://doi.org/10.1071/APP9910086>
- Ceja-Torres LF, Mora-Aguilera G, Téliz D, Mora-Aguilera A, Sánchez-García P, Muñoz-Ruiz C, Tlapal-Bolaños B y De La Torre-Almaraz R. 2008. Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico. *Agrociencia* 42(4): 451-461. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400008&lng=es&nrm=iso
- Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yañez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2019. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1): 71-94. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1809-4>
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2017. Geografía de la DOT. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/> (consulta, enero 2017).
- Fang X, You MP and Barbeti MJ. 2012. Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. *European Journal of Plant Pathology* 134: 619-629. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0042-1>
- Gogoi M, Sarmah DK and Ali S. 2017. Cultural and morphological variations of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causing root rot of patchouli in Assam, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11): 1889-1901. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.225>
- Gómez-Ortiz P, Sánchez-Arizpe A, Virgen-Calleros G, Carvajal-Cazola CR, y Padrón-Corral E. 2011. Incidencia y severidad de la marchitez del *Agave tequilana* Weber var. azul en la zona sur del estado de Nayarit, México. *Agraria* 8: 21-25. [http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/article/45/Agraria_2011\(8\)-2-3.pdf](http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/article/45/Agraria_2011(8)-2-3.pdf)
- Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Martínez-Bolaños M, Hernández-Arenas M y López-Guillén G. 2017. Primer

- registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 150-161. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1608-1>
- Huang J, Pang Y, Zhang F, Huang Q, Zhang M, Tang S, Fu H and Li P. 2019. Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. *European Journal of Plant Pathology* 154: 585-596. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01683-5>
- Jiménez-González LR, Mendoza-Ramos C, Santana-Peñalosa B, Coria-Contreras JJ, Delgado-Mora F, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E y Mora-Aguilera G. 2017. Escala logarítmica diagramática de severidad para medición de pudrición seca del cogollo, marchitez y mancha gris del agave azul. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Jiménez-Hidalgo I, Virgen-Calleros G, Martínez-de la Vega O, Vandemark G and Olalde-Portugal V. 2004. Identification and characterization of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 317-331. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019791.81935.6d>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 388 pp.
- Liew ECY, Laurence MH, Pearce CA, Shivas RG, Johnson GI, Tan YP, Edwards J, Perry S, Cooke AW and Summerell BA. 2016. Review of *Fusarium* species in association with mango malformation in Australia. *Australasian Plant Pathology* 45:547-559. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0454-z>
- O'Donnell K, Ward T, Robert V, Crous P, Geiser D 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>
- Orr R and Nelson PN. 2018. Impacts of soil abiotic attributes on *Fusarium* wilt, focusing on bananas. *Applied Soil Ecology* 132: 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.06.019>
- Parra-Cota FI, García-Pereyra J, Aviña-Martínez GN y de los Santos-Villalobos S. 2018. Primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en *Citrus sinensis* var. Valencia en el Valle del Yaqui, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 193-201. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-3>
- Ramírez-Ramírez MJ, Mancilla-Margalli NA, Meza-Álvarez L, Turincio-Tadeo R, Guzmán-de Peña D and Ávila-Miranda ME. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Protection Science* 53: 144-152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>
- Rincón-Enríquez G, Quiñones-Aguilar E, Qui-Zapata J, Vega-Ramos K y Uvalle-Bueno J. 2014. Selección de bacteriófagos para el control biológico del agente causal de la pudrición del *Agave tequilana*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(S): 112. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento322014.html>
- Rubio CR. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. Pp:169-195. In: Domínguez PJF (ed.). *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana* Weber en la zona con denominación de origen del tequila. Libro técnico No. 4. INIFAP-CIRPAC. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. 196p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/630>
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap> (Consultado enero 2018).
- Vega-Ramos KL, Uvalle-Bueno JX and Gómez-Leyva JF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochemical Genetics* 51: 243-255. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>
- Vetrovsky T, Kolarik M, Zifcakova L, Zelenka T and Baldrian P. 2016. The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources* 16: 388-401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. 315-322. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>

Monitoring severity of *Lophodermium* sp. in pine forest with satellite images Sentinel 2

Monitoreo de la severidad de *Lophodermium* sp. en bosque de pino con imágenes satelitales Sentinel 2

José Antonio Molina-Serrano¹, Marja Liza Fajardo-Franco*, Martín Aguilar-Tlatelpa, Ingeniería Forestal Comunitaria¹, Posgrado en Manejo Sustentable de Recursos Naturales. Universidad Intercultural del Estado de Puebla. Calle principal a Lipuntahuaca S/N. 73475, Lipuntahuaca, Huehuetla, Puebla; Arturo Castañeda-Mendoza¹. *Autor para correspondencia: azilmar@gmail.com

Recibido: 31 de Julio, 2019.

Aceptado: 15 de Noviembre, 2019.

Molina-Serrano JA, Fajardo-Franco ML, Aguilar-Tlatelpa M and Castañeda-Mendoza A. 2020. Monitoring severity of *Lophodermium* sp. in pine forest with satellite images Sentinel 2. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 107-118.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1907-3

Primera publicación DOI: 24 de Noviembre, 2019.

First DOI publication: November 24, 2019.

Resumen. En el presente estudio se estimó la severidad causada por el tizón de los pinos (*Lophodermium* sp.) en rodales de pino mediante imágenes provenientes del satélite Sentinel 2 y evaluaciones de campo. Para tal efecto, se utilizaron tres índices: a) Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI), b) Índice de Estrés de Humedad (MSI) y el Índice de Vegetación Ajustado al Suelo (SAVI); obtenidos de la combinación de bandas satelitales adquiridas mensualmente durante febrero a julio del 2017. Los valores obtenidos por los índices se correlacionaron con la severidad del tizón de los pinos, estimada en 24 sitios de muestreo. Los

Abstract. In this paper, we evaluated satellite images from Sentinel 2 to estimate the severity of needle cast in pine and field evaluations. Three indexes were used: a) Normalized Difference Vegetation Index (NDVI), b) Moisture Stress Index (MSI), and c) Soil-adjusted Vegetation Index (SAVI). These indexes were obtained from the combination of satellite bands acquired monthly during February to July 2017. The values obtained by the indexes were correlated with the severity of needle cast of pine, estimated in 24 sampling sites. The values obtained from MSI correlated positively with the observed values of severity (0.70783, $p < 0.0001$), the values obtained from NDVI had a moderate positive correlation with severity (0.53316, $p < 0.0001$). Nevertheless, the data obtained from SAVI had a low positive correlation with severity (0.24844, $p = 0.0062$). The results showed that the use of satellite images from Sentinel 2 and MSI can be used like a tool for monitoring the severity of *Lophodermium* sp. in pine forest.

Key words: Needle, NDVI, MSI, SAVI, *Pinus* sp.

datos obtenidos mediante el MSI tuvieron una alta correlación positiva con los valores observados de la severidad (0.70783, $p < 0.0001$), mientras que los valores estimados mediante el NDVI y el SAVI tuvieron una moderada (0.53316, $p < 0.0001$) y baja correlación positiva (0.24844, $p = 0.0062$), respectivamente. Los resultados mostraron que el uso de imágenes satelitales Sentinel 2 y el MSI tienen potencial para ser utilizados como una herramienta en el monitoreo de *Lophodermium* sp. en bosque de pino.

Palabras clave: Tizón, NDVI, MSI, SAVI, *Pinus* sp.

Lophodermium sp. es un hongo endófito que pertenece a la familia Rhytismataceae (Rhytismatales, Ascomycota). Se desarrolla intercelularmente entre la epidermis y la hipodermis en las acículas de los pinos, produciendo clorosis que pasa a formar pequeños cuerpos fructíferos tipo apotecio, estos se producen bajo el tejido epidermal de las acículas. El cuerpo fructífero presenta una abertura longitudinal, dentro del cual se encuentran ascosporas sin septos, filiformes y hialinas (Ortiz-García *et al.*, 2003; Cibrián *et al.*, 2007). Este patógeno causa defoliación y disminuye la productividad de los árboles infectados ya que inhibe la fotosíntesis, lo que origina pérdidas a nivel de vivero y bajo condiciones de campo. En Asia, Estados Unidos, Suecia e India, las detecciones e investigaciones se han dirigido hacia la mitigación del impacto de este patógeno en los bosques (Stenström y Ihrmark, 2005; Ahanger *et al.*, 2017; Neimane *et al.*, 2018).

En México *Lophodermium* sp. ha causado daños en bosques afectando varias especies de pino que muestran susceptibilidad como *Pinus oaxacana*, *P. patula*, *P. montezumae*, *P. teocote*, *P. pseudostrobus* y *P. leiophylla* (CONAFOR, 2018). En el 2015 la enfermedad afectó zonas forestales en los

Lophodermium sp. is an endophytic fungus belonging to the Rhytismataceae family (Rhytismatales, Ascomycota). It grows intracellularly between the epidermis and hypodermis of pine needles and produces chlorosis, which then forms apothecium-type small fruitful bodies beneath the epidermal tissue of the needles. The fruitful bodies have a longitudinal opening where filiform and hyaline ascospores with no septa are stored (Ortiz-García *et al.*, 2003; Cibrián *et al.*, 2007). This pathogen causes defoliation and reduces the productivity of infected trees because it inhibits photosynthesis, which causes losses both in the greenhouse and under field conditions. In Asia, the United States, Sweden and India, detection and research have focused on mitigating the impact of the pathogen in forests (Stenström and Ihrmark, 2005; Ahanger *et al.*, 2017; Neimane *et al.*, 2018).

In Mexico, *Lophodermium* sp. has caused damage in forests by affecting several susceptible pine species such as *Pinus oaxacana*, *P. patula*, *P. montezumae*, *P. teocote*, *P. pseudostrobus* and *P. leiophylla* (CONAFOR, 2018). In 2015, the disease affected forests in the states of Tlaxcala and Hidalgo, and at least 3,000 hectares sown to pines in the Sierra Norte de Puebla (Claudio *et al.*, 2012; Reséndiz *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2016). It is estimated that, due to climate change, the pathogen could find favorable conditions for a wider distribution in Mexico (Pérez *et al.*, 2016). For this reason, research must be conducted to monitor and predict the disease in order to minimize the loss of forest production and ecosystem services (Sacristán, 2006; Sturrock *et al.*, 2011; Millar and Stephenson, 2015; Seidl *et al.*, 2017). In view of this challenge, the use of satellite images is an alternative for monitoring and evaluating the epidemiology of *Lophodermium*, since their viability is based on the biophysical and biochemical changes that occur in the plant cover during the

estados de Tlaxcala e Hidalgo, así como al menos 3,000 hectáreas de pino en la Sierra Norte de Puebla (Claudio *et al.*, 2012; Reséndiz *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2016). Se estima que ante los escenarios de cambio climático este patógeno podría encontrar condiciones favorables para una mayor distribución en México (Pérez *et al.*, 2016). Por tal motivo, es necesario realizar investigaciones enfocadas al monitoreo y predicción de la enfermedad que contribuyan a minimizar la pérdida de la producción forestal y de sus servicios ecosistémicos (Sacristán, 2006; Sturrock *et al.*, 2011; Millar y Stephenson, 2015; Seidl *et al.*, 2017). Ante esta problemática, el uso de imágenes satelitales es una alternativa para el monitoreo y evaluación epidemiológica de *Lophodermium*, su viabilidad está fundamentada en los cambios biofísicos y bioquímicos que sufre la cubierta vegetal durante el desarrollo epidémico de la enfermedad, así como en alteraciones en los pigmentos que absorben la luz, en la estructura interna de la hoja y en el contenido de humedad a nivel celular, que se reflejan en la respuesta espectral (Chuvieco, 1996; Peña y Altmann, 2009; Rullan-Silva *et al.*, 2013; Alizadeh *et al.*, 2017). Estos cambios pueden ser identificados mediante la combinación de bandas satelitales proveniente del satélite Sentinel-2 y el uso de índices de vegetación como el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) y el índice de estrés de humedad (MSI), principalmente con bandas en el rango del infrarrojo cercano (NIR) y el infrarrojo medio o de onda corta (SWIR) (James *et al.*, 2013; Houborg *et al.*, 2015; Rullan-Silva *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2018).

Cano *et al.* (2005), utilizaron imágenes multiespectrales del sensor IKONOS e índices de vegetación para estudiar el proceso de decaimiento en masas de *Quercus suber* en el sur de España afectadas por *Phytophthora cinnamomi*. De igual forma, Navarro-Cerrillo *et al.* (2007) se apoyaron de las imágenes del satélite ASTER y del NDVI

epidemic development of the disease, as well as on the alterations in the pigments that absorb the light, the internal structure of the leaf and the moisture content at the cellular level, which are reflected in the spectral response (Chuvieco, 1996; Peña and Altmann, 2009; Rullan-Silva *et al.*, 2013; Alizadeh *et al.*, 2017). These changes can be identified by combining the satellite bands from the Sentinel-2 satellite and using vegetation indexes such as the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) and the Moisture Stress Index, mainly with bands ranging from near-infrared (NIR) and mid-infrared, or short-wave infrared (SWIR) (James *et al.*, 2013; Houborg *et al.*, 2015; Rullan-Silva *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2018).

Cano *et al.* (2005) used multispectral images from the IKONOS sensor and vegetation indexes to study the mass decay process in *Quercus suber* affected by *Phytophthora cinnamomi* in southern Spain. Similarly, Navarro-Cerrillo *et al.* (2007) used images from the ASTER satellite and NDVI to map defoliation caused by mass decay of *Pinus sylvestris* and *P. nigra* in Sierra de los Filabres in Spain. Yu *et al.* (2018) identified infection spots and, using NDVI, Normalized Difference Moisture Index (NDMI) and MSI, estimated the severity of the damage caused by *Tomicus yunnanensis* and *Tomicus minor* in *Pinus yunnanensis*, while Sangüesa-Barrera *et al.* (2014) studied the level of severity caused by *Thaumetopoea pityocampa* in pine forests using vegetation indexes including MSI, NDVI and SAVI. Therefore, the objective of this study was to evaluate the use of satellite images from Sentinel 2 to estimate the level of severity caused by needle cast of pine (*Lophodermium* sp.) using vegetation indexes.

The study was conducted in the ejido lands of Xonocuautila, Tlatlauquitepec, located in the northeast area of the state of Puebla, Mexico, coordinates 19.731326 and -97.5494835, at 2,530 masl, from

para cartografiar la defoliación causada por el decaimiento de masa de *Pinus sylvestris* y *P. nigra* en la Sierra de los Filabres en España. Yu *et al.* (2018) identificaron focos de infección y estimaron la severidad del daño ocasionado por *Tomicus yunnanensis* y *Tomicus minor* en *Pinus yunnanensis* mediante el NDVI, el Índice Normalizado de la Diferencia de Humedad (NDMI) y el MSI. Mientras que Sangüesa-Barrera *et al.* (2014) estudiaron la severidad de *Thaumetopoea pityocampa* en bosques de pino mediante índices de vegetación como el MSI, NDVI y SAVI. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad de las imágenes satelitales Sentinel 2 para estimar la severidad causada por el tizón de los pinos (*Lophodermium* sp.), mediante índices de vegetación.

La investigación se realizó al noreste del estado de Puebla, México en el ejido de Xonocuatla, Tlatlauquitepec, a una altitud de 2,530 msnm, en las coordenadas 19.731326 y -97.5494835, durante febrero a julio del 2017 en 303 ha de uso forestal donde crecen especies de pino (*Pinus patula*, *P. montezumae*) susceptibles a *Lophodermium* sp. (CONAFOR, 2018). Se definieron 24 sitios de muestreo, los cuales estuvieron georreferenciados y distribuidos al azar. Cada sitio correspondió a parcelas circulares con un radio de 4.9 m, y un área de 75.4 m², donde se evaluó la incidencia estimando la proporción de árboles enfermos. Mientras que la severidad se estimó considerando el porcentaje de copa en cada árbol ubicado dentro de la circunferencia, para lo cual se usó una escala de severidad donde 0=sin observación de síntomas, 1=clorosis del follaje >0-5%, 2=clorosis del follaje >5-25%, 3= clorosis y necrosis del follaje moderado >25-50%, 4=clorosis y necrosis del follaje grave >50-75% y 5=follaje con necrosis >75-100% (Campbell y Neher, 1994; Cayuela *et al.*, 2014). En total se evaluaron 221 árboles. La identidad de *Lophodermium* sp. fue corroborada mediante observaciones al

February to July 2017, in 303 ha of forest where pine species grow (*Pinus patula*, *P. montezumae*) that are susceptible to *Lophodermium* sp. (CONAFOR, 2018). Samples were taken in 24 sites that were georeferenced and randomly distributed. Each site corresponded to circular plots with a radius of 4.9 m and an area of 75.4 m², where the disease incidence was evaluated by estimating the ratio of infected trees. The disease severity was estimated by determining the percentage of canopy in each tree inside the circumference; this was done by using a 0-5 severity scale, where 0=no symptoms observed; 1=canopy chlorosis >0-5%; 2=canopy chlorosis >5-25%; 3= moderate canopy chlorosis and necrosis >25-50%, 4=severe canopy chlorosis and necrosis >50-75%; and 5=necrotic canopy >75-100% (Campbell and Neher, 1994; Cayuela *et al.*, 2014). A total of 221 trees were evaluated. The identity of *Lophodermium* sp. was corroborated through observations under a compound and dissecting microscope (Ortiz-García *et al.*, 2003; Herrera and Ulloa, 2013; Koukol *et al.*, 2015). The evaluations were conducted on February 23, March 18, April 16, May 14, June 3, June 23, and July 13, 2017; on those same days, satellite images were obtained. Additionally, from the National Phytosanitary Epidemiological Reference Laboratory, data on the temperature, relative humidity and dew point (minimum, average and maximum) in the municipality of Tlatlauquitepec during the study period were consulted (LANREF-DGSV, 2019).

At the same time, five images from the Sentinel 2 satellite were downloaded from the official Sentinel platform (<https://scihub.copernicus.eu/dhus/#/home>); the images were selected because they were cloudless and coincided with the dates on which the disease was evaluated in the field. The images corresponded to the following dates: February 23, May 14, June 3, June 23 and July 13, 2017. These

microscopio de disección y compuesto (Ortiz-García *et al.*, 2003; Herrera y Ulloa, 2013; Koukol *et al.*, 2015). Las evaluaciones se realizaron los días 23 de febrero, 18 de marzo, 16 de abril, 14 mayo, 3 de junio, 23 de junio y el 13 de julio del 2017, lo cual coincidió con la obtención de imágenes satelitales. Adicionalmente, se consultaron datos del Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria relacionados con temperatura, humedad relativa y punto de rocío (mínimas, medias y máximas) del municipio de Tlatlauquitepec correspondientes al periodo de estudio (LANREF-DGSV, 2019).

Paralelamente, se obtuvieron cinco imágenes emitidas por el satélite Sentinel 2, descargadas desde la plataforma oficial de Sentinel: <https://scihub.copernicus.eu/dhus/#/home>, las cuales fueron elegidas por estar libres de nubosidad y corresponder con las fechas de evaluación de la enfermedad en campo. Las imágenes correspondieron a los días: 23 de febrero, 14 mayo, 3 de junio, 23 de junio y 13 de julio del 2017. Éstas fueron utilizadas debido al potencial de sus características, especialmente de las bandas infrarrojas (NIR), las cuales permiten diferenciar la reflectancia entre biomasa sana y enferma en ecosistemas forestales (ESA, 2015; Chemura *et al.*, 2017; Zarco-Tejada *et al.*, 2019).

Cada una de las imágenes satelitales fueron procesadas para convertir los números digitales (ND) a reflectancia TOA (top-of-atmosphere), para lo cual, este valor se dividió entre el factor de escala 10,000 (Gascon *et al.*, 2016). Posteriormente, cada imagen fue sometida a un proceso de corrección atmosférica mediante el módulo ATCOR, el cual está basado en el modelo MODTRAN (Moderate Resolution Atmospheric Transmission), que modela las condiciones atmosféricas imperantes al momento de paso de la plataforma por un área dada (Peña y Altmann, 2009). Estos procesos fueron realizados mediante el software Geomatica 2017 y ArcGis

images were used because of the potential of their characteristics, especially the infrared bands (NIR) that make it possible to differentiate the reflectance between healthy and infected biomass in forest ecosystems (ESA, 2015; Chemura *et al.*, 2017; Zarco-Tejada *et al.*, 2019).

Each satellite image was processed to convert the digital numbers (DN) to top-of-atmosphere (TOA) reflectance, for which this value was divided by a 10,000-scale factor (Gascon *et al.*, 2016). Each image was later submitted to an atmospheric correction process using the ATCOR module, which is based on the MODTRAN model (Moderate Resolution Atmospheric Transmission) that models the prevailing atmospheric conditions at the time the platform passes over a given area (Peña and Altmann, 2009). These processes were carried out using Geomatica 2017 and ArcGis 10.2 software. The NDVI, MSI and SAVI indexes were estimated using the corrected multispectral data (Rouse *et al.*, 1974; Rock *et al.*, 1986; Huete, 1988). The results of each estimated index were re-scaled and indexes at the 0 to 1 levels were obtained, where, in the case of NDVI and SAVI, 1 corresponded to 100% severity, and in the case of MSI, 1 corresponded to absence of the disease (Sangüesa *et al.*, 2014). The vegetation indexes were estimated by processing satellite images using ArcGis 10.2 software. The climatic variables were analyzed to determine their correlation with the incidence and severity. The values of disease severity caused by *Lophodermium* sp. that were obtained in the field and the values obtained from the indexes by processing the satellite images were subjected to an analysis of correlation using the R statistical software (Cano *et al.*, 2005).

The incidence of *Lophodermium* sp. was moderate-to-high (64-98%) with low-to-moderate severity (< 33%). In February, the average severity reached 7.1%, while in March the severity increased

10.2. Con los datos multispectrales corregidos se estimó el NDVI, el MSI y el SAVI (Rouse *et al.*, 1974; Rock *et al.*, 1986; Huete, 1988). Los resultados de cada uno de los índices estimados fueron re-escalados y se obtuvieron índices en niveles de cero a uno, donde uno correspondió a una severidad de 100% para el caso del índice NDVI y SAVI, mientras que para el MSI un valor de uno correspondió a la ausencia de la enfermedad (Sangüesa *et al.*, 2014). Los índices de vegetación se estimaron mediante el procesamiento de las imágenes satelitales en el software ArcGis 10.2. Las variables climáticas se sometieron a análisis de correlación con la incidencia y severidad. Los valores de la severidad de *Lophodermium* sp. obtenidos en campo y los valores arrojados por los índices obtenidos mediante el procesamiento de las imágenes satelitales se sometieron a un análisis de correlación mediante el paquete estadístico R (Cano *et al.*, 2005).

La incidencia de *Lophodermium* sp. fue moderada a alta (64 - 98%) con severidades bajas a moderadas (< 33 %). En el mes de febrero se observó una severidad promedio de 7.1%, en el mes de marzo la severidad incrementó y alcanzó un valor de 13.8%. Sin embargo, en el mes de abril y mayo se observó un decremento en la severidad (11.9% y 10.6% respectivamente), esto pudo deberse a la caída de acículas enfermas. Durante los primeros días del mes de junio la severidad incrementó (13.0%) y continuó con esta tendencia durante la siguiente evaluación (25.7%). Finalmente, para el mes de julio la severidad alcanzó un valor de 32.8% (Figura 1A). Durante este periodo, la humedad relativa fue alta (61.0 - 99.6%) con temperaturas medias entre 15.7 y 24.5 °C (Figura 1B).

Estas condiciones son favorables para el desarrollo de *Lophodermium*, ya que se ha reportado que una alta humedad relativa con temperaturas entre 14 y 22 °C son óptimas para su desarrollo, aunque sobrevive a temperaturas mínimas entre -2

and reached a value of 13.8%. However, in April and May, the severity decreased (11.9% and 10.6%, respectively), which could be due to the fall of infected needles. During the first days of June, the severity increased (13.0%) and continued to grow during the following evaluation (25.7%). Finally, in July, the severity reached a value of 32.8% (Figure 1A). During this period, the relative humidity was high (61.0-99.6%) with average temperatures between 15.7 and 24.5 °C (Figure 1B).

These conditions are favorable for the development of *Lophodermium* since it has been reported that high relative humidity with temperatures between 14 and 22 °C are optimum for the pathogen to develop, although it can survive at minimum temperatures of -2 to 1 °C, and maximum temperatures of 25 to 35 °C (Ahanger *et al.*, 2016; Polmanis *et al.*, 2017).

Disease severity was moderately correlated with climatic variables, mainly with relative humidity (0.50938, $p=0.2429$). However, the incidence had a positive correlation with the average relative humidity (0.8611, $p=0.0128$) and with the average dew point (0.8415, $p=0.0175$). These results are in agreement with those reported by Ahanger *et al.* (2016) and Polmanis *et al.* (2017), who indicated that the combination of optimum temperatures with high relative humidity influences *Lophodermium* sp. expression and spread.

The correlation analysis using the data estimated by MSI and the observed values indicated a correlation of 0.70783, $p<0.0001$; the estimation of severity using this index is shown in Figure 2. The MSI has been used to evaluate defoliation in pine forests because of its sensitivity to detecting changes in water content in vegetation, a fact that is closely related to the weakness or vulnerability of pine trees to pest and disease attacks (Townsend *et al.*, 2012; Sangüesa *et al.*, 2014; Rullán *et al.*, 2015).

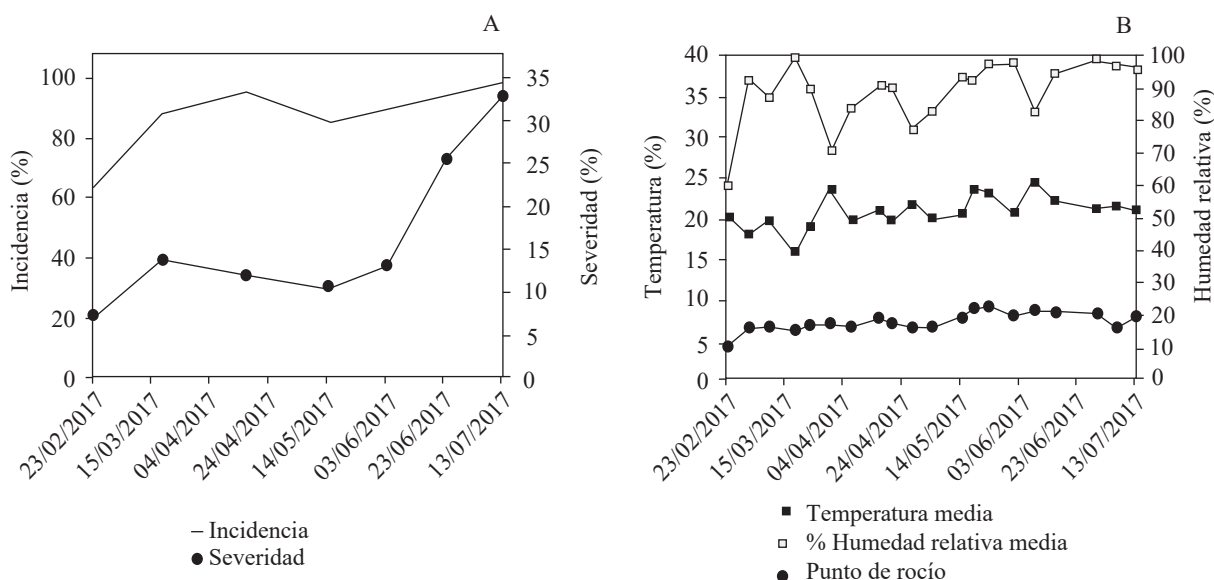


Figura 1. Incidencia y severidad de *Lophodermium* sp. en bosque de pino en Xonocuatla, Tlatlauquitepec y su relación con variables climáticas. A) Desarrollo del tizón de los pinos. B) Variables climáticas. Cada punto representa la media.
Figure 1. Incidence and severity of the damage caused by *Lophodermium* sp. in pine forests in Xonocuatla, Tlatlauquitepec, and their relationship with climatic variables. A) Development of needle cast of pine. B) Climatic variables. Each point represents the mean.

a 1 °C y máximas de 25 a 35 °C (Ahanger *et al.*, 2016; Polmanis *et al.*, 2017).

La severidad mostró una correlación moderada con las variables climáticas, principalmente con la humedad relativa (0.50938, $p=0.2429$). Mientras que la incidencia tuvo una correlación positiva con la humedad relativa media (0.8611, $p=0.0128$) y con el punto de rocío medio (0.8415, $p=0.0175$). Estos resultados coinciden con lo reportado por Ahanger *et al.* (2016) y Polmanis *et al.* (2017) quienes indicaron que la combinación de temperaturas óptimas con alta humedad relativa influye en la expresión y dispersión de *Lophodermium* sp.

El análisis de correlación realizado con los datos estimados por el MSI y los valores observados indicó una correlación de 0.70783, $p<0.0001$; la estimación de la severidad con este índice se muestra en la Figura 2. El MSI se ha utilizado en la evaluación de la defoliación de bosques de pino debido a su sensibilidad para detectar los cambios

On the other hand, data estimated using NDVI and the data observed had a correlation of 0.53316, $p<0.0001$; the values estimated using NDVI are shown in Figure 3. James *et al.* (2013) and Zarco-Tejada *et al.* (2018) demonstrated that the NDVI obtained using images from the Sentinel 2 satellite had adequate capacity to evaluate the chlorophyll content. MSI and NDVI are indexes that are highly related with the chlorophyll and water content in trees and have been used to evaluate forest mass decay caused by foliar pests and diseases (Peña and Altmann, 2009; Olsson *et al.*, 2016).

These results are in agreement with those reported by Yu *et al.* (2018), where MSI was more precise when estimating *Tomicus* sp. severity in *Pinus yunnanensis* compared to NDVI and the Normalized Difference Moisture Index (NDMI).

The estimated severity using SAVI had a low correlation with the observed severity (0.24844, $p=0.0062$), which could be due an overestimation

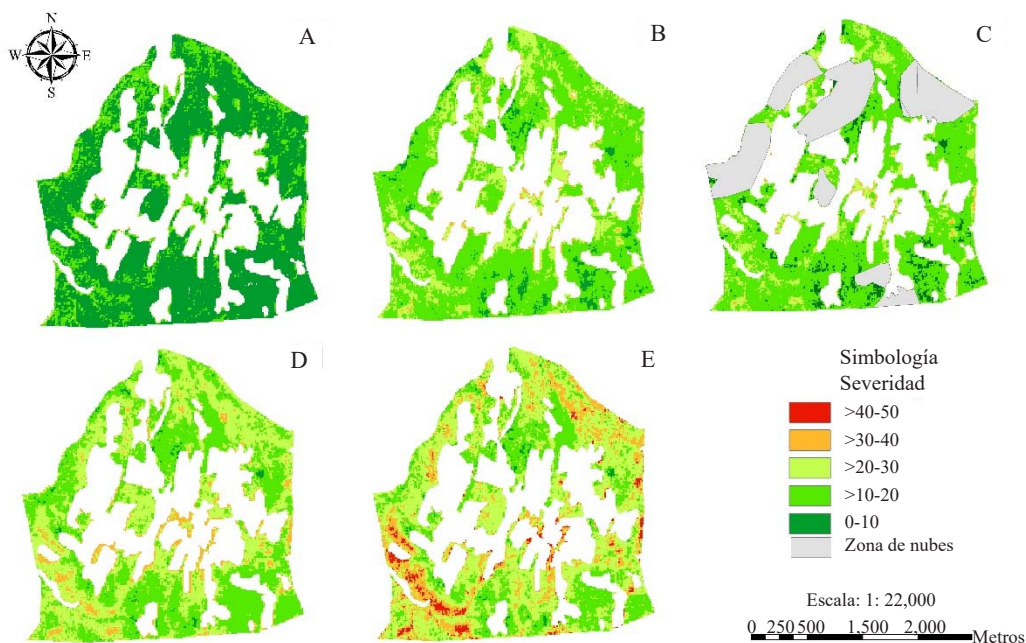


Figura 2. Severidad de *Lophodermium* sp. en Xonocuatla, Tlatlauquitepec, estimada mediante el Índice de Estrés de Humedad (MSI) obtenido de imágenes satelitales Sentinel 2 en el año 2017: A) 23 febrero, B) 14 de mayo, C) 03 de junio, D) 23 de junio, E) 13 julio. Las zonas blancas en cada mapa corresponden a áreas de cultivo.
Figure 2. Severity of damage caused by *Lophodermium* sp. in Xonocuatla, Tlatlauquitepec, estimated using the Moisture Stress Index (MSI) obtained using images from the Sentinel 2 satellite in 2017: A) February 23; B) May 14; C) June 03; D) June 23; E) July 13. The white areas on each map indicate cropping regions.

en el contenido del agua en la vegetación lo cual está estrechamente relacionado con la debilidad o vulnerabilidad del pino ante el ataque de plagas y enfermedades (Townsend *et al.*, 2012; Sangüesa *et al.*, 2014; Rullán *et al.*, 2015).

Por otra parte, los datos estimados por el NDVI y los observados tuvieron una correlación de 0.53316, $p < 0.0001$; los valores estimados por este índice se presentan en la Figura 3. James *et al.* (2013) y Zarco-Tejada *et al.* (2018), probaron que el NDVI obtenido a partir de imágenes Sentinel 2, tuvieron una adecuada capacidad para evaluar el contenido de clorofila. El MSI y el NDVI son índices que están fuertemente relacionados al contenido de clorofila y agua que tienen los árboles, y han

of that variable, along with the effect soil has on the reflectance (Figure 4). Sangüesa *et al.* (2014) used SAVI to study defoliation in pine trees caused by *Thaumetopoea pityocampa*, but the index had limitations when distinguishing changes in plant cover.

The analysis allowed detecting differences in the sensitivity of each index to evaluate changes in plant canopy health. MSI had a positive and higher correlation compared to NDVI and SAVI. Therefore, the results obtained suggest that satellite images from Sentinel 2 and MSI can be used as a tool to monitor the severity of needle cast of pine. These results provide information about the space-time behavior of *Lophodermium* sp. in pine forests

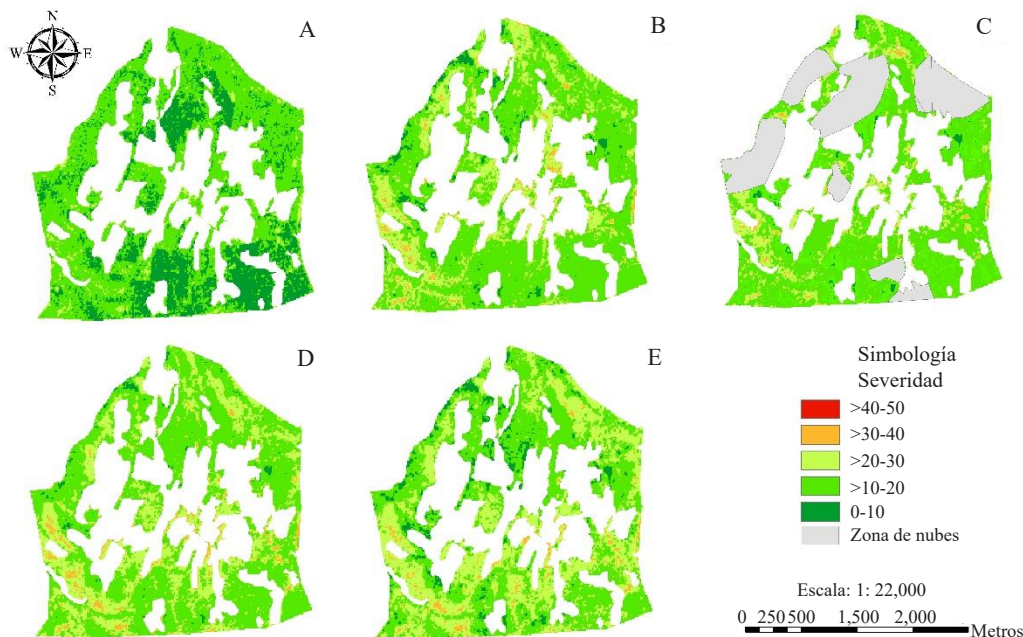


Figura 3. Severidad de *Lophodermium* sp. estimada en Xonocuatla, Tlatlauquitepec, mediante el Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI) obtenido de imágenes satelitales Sentinel 2 en el año 2017: A) 23 febrero, B) 14 de mayo, C) 03 de junio, D) 23 de junio, E) 13 julio. Las zonas blancas en cada mapa corresponden a áreas de cultivo.

Figure 3. Severity of damage caused by *Lophodermium* sp. in Xonocuatla, Tlatlauquitepec, estimated using the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) obtained using images from the Sentinel 2 satellite in 2017: A) February 23; B) May 14; C) June 03; D) June 23; E) July 13. The white areas on each map indicate cropping regions.

sido utilizados en la evaluación del decaimiento de las masas forestales a causa de plagas o enfermedades foliares (Peña y Altmann, 2009; Olsson *et al.*, 2016).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Yu *et al.* (2018), donde el MSI tuvo una mayor precisión para estimar la severidad de *Tomicus* sp. en *Pinus yunnanensis*, en comparación con el NDVI y el Índice Normalizado de la Diferencia de Humedad (NDMI).

La severidad estimada mediante el índice SAVI tuvo una baja correlación con la severidad observada (0.24844, $p=0.0062$), lo que implicó una sobreestimación de dicha variable, aunado al efecto

in Mexico, which, once they are validated through further studies, can be used in forest management programs.

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

del suelo sobre la reflectancia (Figura 4). Sangüesa *et al.* (2014), utilizaron el índice SAVI para estudiar la defoliación en bosques de pino causada por *Thaumetopoea pityocampa* sin embargo, este índice mostró limitaciones para distinguir los cambios en la cobertura vegetal.

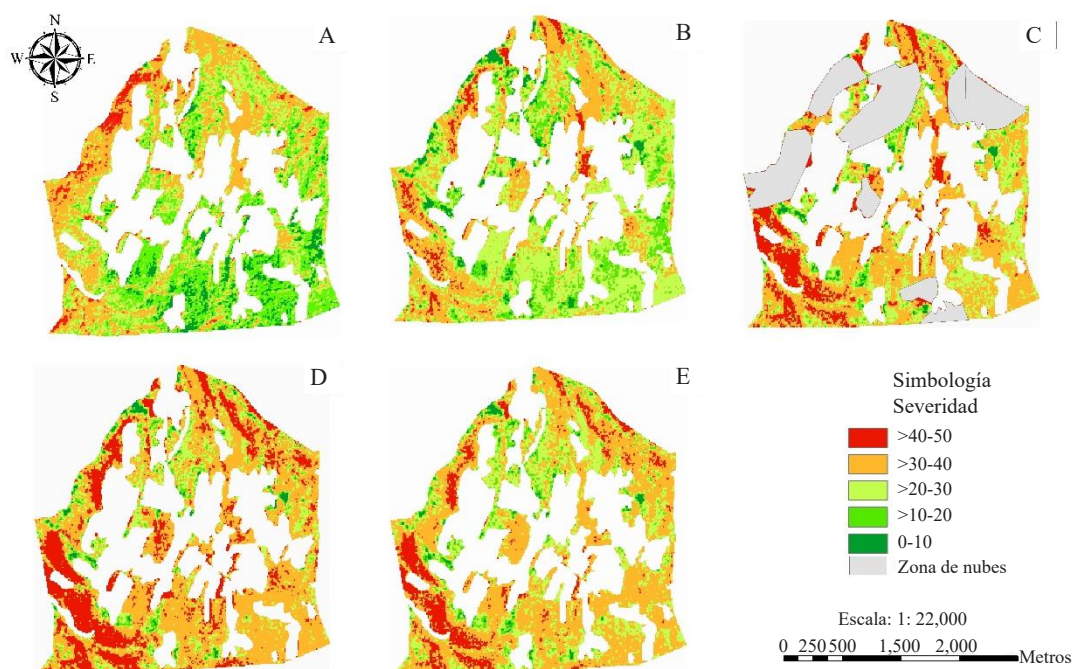


Figura 4. Severidad de *Lophodermium* sp. estimada en Xonocuautla, Tlatlauquitepec, mediante el Índice de Vegetación Ajustado al Suelo (SAVI) obtenido de imágenes satelitales Sentinel 2 en el año 2017: A) 23 febrero, B) 14 de mayo, C) 03 de junio, D) 23 de junio, E) 13 julio. Las zonas blancas en cada mapa corresponden a áreas de cultivo.  
Figure 4. Severity of damage caused by *Lophodermium* sp. in Xonocuautla, Tlatlauquitepec, estimated using the Soil Adjusted Vegetation Index (SAVI) obtained using images from the Sentinel 2 satellite in 2017: A) February 23; B) May 14; C) June 03; D) June 23; E) July 13. The white areas on each map indicate the cropping regions.

El análisis permitió detectar diferencias en la sensibilidad de cada índice para evaluar los cambios en la sanidad del dosel vegetal. El índice MSI tuvo una correlación positiva y superior en comparación a los índices NDVI y SAVI. Por lo tanto, los resultados sugieren que las imágenes satelitales Sentinel 2 y el índice MSI pueden ser utilizados como una herramienta en el monitoreo de la severidad del tizón de los pinos; estos resultados proveen información sobre el comportamiento espacio-temporal de *Lophodermium* sp. en bosques de pino en México, que previa validación con estudios de mayor duración, pueden ser utilizados en programas de manejo forestal.

## LITERATURA CITADA

- Ahanger FA, Dar GH, Beig MA, Sofi TA, and Ganie SA. 2016. Effect of weather parameters on Blue pine (*Pinus wallichiana* J.) needle blight and ascospore release of *Lophodermium pinastri* in India. International Journal of Agricultural Technology 12:1099-1112. [http://www.ijat-aatsea.com/past\\_v12\\_n6.html](http://www.ijat-aatsea.com/past_v12_n6.html)
- Ahanger FA, Hassan DG, Being MA, Sofi TA, Shah MD and Ganaie SA. 2017. *In vitro* evaluation of fungicides against *Lophodermium pinastri* causing needle blight disease of blue pine in Kashmir (India). SKUAST Journal of Research 19:66-71. <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:skuastjr&volume=19&issue=1&article=007>
- Alizadeh M, Moharrami M and Rasouli AA. 2017. Geographic Information System (GIS) as a Tool in the Epidemiological Assessment of Wetwood Disease on elm Trees in Tabriz City, Iran. Cercetari Agronomice in Moldova 50:91-100. <https://doi.org/10.1515/cerce-2017-0018>



- Campbell CL and Neher DA. 1994. Estimating Disease Severity and Incidence. Pp. 117-147. In: Campbell CL y Benson DM (eds.). *Epidemiology and Management of Root Diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg. 344 p. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9_5)
- Cano F, Navarro RM, García A, y Sánchez De La Orden M. 2005. Evaluación de la defoliación mediante imágenes IKONOS en masas de *Quercus suber* L. en el sur de España. *Investigaciones Agrarias: Sistemas y Recursos Forestales* 14:242-252. <https://recyt.fecyt.es/index.php/IA/article/view/2280/1687>
- Cayuela L, Hernández R, Hódar JA, Sánchez G and Zamora R. 2014. Tree damage and population density relationships for the pine processionary moth: Prospects for ecological research and pest management. *Forest Ecology and Management* 328:319-325. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.05.051>
- Chemura A, Mutanga O and Dube T. 2017. Separability of coffee leaf rust infection levels with machine learning methods at Sentinel-2 MSI spectral resolutions. *Precision Agriculture* 18:859-881. <https://doi.org/10.1007/s11119-016-9495-0>
- Chuvienco E. 1996. *Fundamentos de Teledetección espacial*. Editorial Rialp. Madrid. 568 p.
- Cibrián TD, García DS, Alvarado RD, Colomo GI, Palacios HG, Meléndez HF y Sámano MJ. 2007. En: Cibrián TD, Alvarado RD, García DS. 2007. *Enfermedades Forestales en México*. 1ra. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México, México. 585 p.
- Claudio GL, Góngora RF, Toledo GS, Jaime GR y García QE. 2012. Evaluación de daños por patógenos fúngicos en *Pinus* y *Quercus* del Área de Protección de Flora y Fauna "La Primavera" Jalisco, México. *Acta Universitaria* 22:5-12. <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/view/397>
- CONAFOR. 2018. Diagnóstico fitosanitario del estado de Puebla. Comisión Nacional Forestal. Gerencia Estatal Puebla. México. 25 p. <http://sivicoff.cnf.gob.mx/firmProgramasde-trabajoanuales.aspx>
- ESA. 2015. Sentinel-2 User handbook. Standar document. European Space Agency. Issue 1, Review 2. 64 p.
- Gascon F, Thépaut O, Jung M, Francesconi B, Louis J, Lonjou V, Lafrance B, Massera S, Gaudel-Vacaresse A, Languille F, Alhammoud B, Viallefont F, Pflug B, Bieniarz J, Clerc S, Pessiot L, Trémas T, Cadau E, De Bonis R, Isola C, Martimort P and Fernandez V. 2016. Copernicus Sentinel-2 Calibration and Products Validation Status. *Remote Sensing* 9:584. <https://doi.org/10.3390/rs9060584>
- Herrera T y Ulloa M. 2013. El reino de los hongos. *Micología básica aplicada*. Segunda Reimpresión. UNAM. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 551 p.
- Houborg R, Fisher JB and Skidmore AK. 2015. Advances in remote sensing of vegetation function and traits. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 43:1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jag.2015.06.001>
- Huete A. 1988. A soil-adjusted vegetation index (SAVI). *Remote Sensing of Environment* 25:295-309. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(88\)90106-X](https://doi.org/10.1016/0034-4257(88)90106-X)
- James FW, Dash J, Watmough G and James ME. 2013. Evaluating the capabilities of Sentinel-2 for quantitative estimation of biophysical variables in vegetation. *Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 82: 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2013.04.007>
- Koukol O, Pusz W and Minter D. 2015. A new species of *Lophodermium* on needles of mountain pine (*Pinus mugo*) from the Giant Mountains in Poland. *Mycological Progress* 14:1-13. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1038-y>
- LANREF-DGSV. 2019. Datos climáticos. Laboratorio Nacional de Referencia Fitosanitaria-Dirección General de Sanidad Vegetal. [www.royacafe.lanref.org.mx](http://www.royacafe.lanref.org.mx) (Consulta, octubre 2019).
- Millar CI and Stephenson NL. 2015. Temperate forest health in an era of emerging megadisturbance. *Science* 349:823-826. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9933>
- Navarro-Cerrillo RM, Varo MA, Lanjeri S, y Hernández-Clemente R. 2007. Cartografía de defoliación en los pinares de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) y pino salgareño (*Pinus nigra* Arnold.) en la Sierra de los Filabres. *Ecosistemas* 16: 163-171. <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/download/464/445>
- Neimane U, Polmnis K, Zaluma A, Klavina D, Gaitnieks T and Jansons A. 2018. Damage caused by *Lophodermium* needle cast in open-pollinated and control-crossed progeny trials of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *The Forestry Chronicle* 94:155-161. <https://doi.org/10.5558/tfc2018-024>
- Olsson PO, Lindström J and Eklundh L. 2016. Near real-time monitoring of insect induced defoliation in subalpine birch forests with MODIS derived NDVI. *Remote Sensing of Environment* 181:42-53. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2016.03.040>
- Ortiz-García S, Germandt DS, Stone JK, Johnston PR, Chape-la IR, Salas LR and Alvarez BE. 2003. Phylogenetics of *Lophodermium* from pine. *Mycologia* 95:846-859. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833044>
- Peña MA y Altmann SH. 2009. Reconocimiento del efecto de *Cinara cupressi* (Hemiptera: Aphididae) en el estado sanitario de *Austrocedrus chilensis* mediante imágenes multiespectrales. *Bosque* 30:151-158. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002009000300005>
- Pérez MR, Romero SM, González HA, Pérez SE y Arriola PJ. 2016. Distribución Potencial de *Lophodermium* sp. en Bosques de Coníferas de Puebla y Estados Próximos, con Escenarios de Cambio Climático. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 7:81-97. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i36.61>
- Polmanis K, Gaitnieks T, Beļevičam V, Rungis D and Bauma-ne A. 2017. Occurrence of *Lophodermium* spp. in young scots pine stands in Latvia. *Forestry and Wood Processing* 1:1-20.
- Reséndiz MJ, Guzmán DL, Muñoz VA, De Pascual PC y Olvera CL. 2015. Enfermedades foliares del arbolado en el Parque Cultural y Recreativo Tezozómoc, Azcapotzalco, D.F. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 6:106-123. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i30.211>
- Rock BN, Vogelmann, JE, Williams DL, Vogehmann AF and Hoshizaki T. 1986. Remote detection of forest

- damage. *Ecology from Space* 36:439-445. <https://doi.org/10.2307/1310339>
- Rouse JW, Haas RH, Schell JA and Deering DW. 1974. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. Pp. 309-317. In: Freden SC, Mercanti EP, Becker MA. (eds.). *Third Earth Resources Technology Satellite-1 Symposium*, Washington DC. 1008 p. <https://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19740022614>
- Rullán-Silva CD, Olthoff AE, Delgado de la Mata JA and Pajares-Alonso JA. 2013. Remote monitoring of forest insect defoliation. A review. *Forest Systems* 22:377-391. <https://doi.org/10.5424/fs/2013223-04417>
- Rullán-Silva C, Olthoff AE, Pando V, Pajares JA and Delgado JA. 2015. Remote monitoring of defoliation by the beech leaf-mining weevil *Rhynchaenus fagi* in northern Spain. *Forest Ecology and Management* 347:200-208. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.03.005>
- Sacristán RF. 2006. La Teledetección satelital y los sistemas de protección Ambiental. Universidad Complutense de Madrid. *Aqua TIC* 24:13-41. <https://doi.org/10.22518/16578953.701>
- Sangüesa BG, Camarero JJ, García MA, Hernández R and De la Riva J. 2014. Remote-sensing and tree-ring based characterization of forest defoliation and growth loss due to the Mediterranean pine processionary moth. *Forest Ecology and Management* 320:171-181. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.03.008>
- Seidl R, Thom D, Kautz M, Martín BD, Peltoniemi M, Vacchiano G, Wild J, Ascoli D, Petr M, Honkaniemi J, Lexer M, Trotsiuk V, Mairota P, Svoboda M, Fabrika M, A. Nagel T and Reyer C. 2017. Forest disturbances under climate change. *Nature Climate Change* 7:395-402. <https://doi.org/10.1038/nclimate3303>
- Stenström BE and Ihrmark K. 2005. Identification of *Lophodermium seditiosum* and *L. pinastri* in Swedish forest nurseries using species-specific PCR primers from the ribosomal ITS region. *Forest Pathology* 35:163-172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2005.00398.x>
- Sturrock RN, Frankel SJ, Brown AV, Hennon PE, Kliejunas JT, Lewis KJ, Worrall JJ and Woods AJ. 2011. Climate change and forest diseases. *Plant Pathology* 60:133-149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02406.x>
- Townsend PA, Singh A, Foster JR, Rehberg NJ, Kingdon CC, Eshleman KN and Seagle SW. 2012. A general Landsat model to predict canopy defoliation in broadleaf deciduous forests. *Remote Sensing of Environment* 119:255-265. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.12.023>
- Yu L, Huang J, Zong S, Huang H, and Luo Y. 2018. Detecting shoot beetle damage on yunnan pine using landsat time-series data. *Forests* 9:2-14. <https://doi.org/10.3390/f9010039>
- Zarco-Tejada PJ, Hornero A, Becka PSA, Kattenbornd T, Kempeneers P and Hernández-Clemente R. 2019. Chlorophyll content estimation in an open-canopy conifer forest with Sentinel-2A and hyperspectral imagery in the context of forest decline. *Remote Sensing of Environment* 223:320-335. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.01.031>
- Zarco-Tejada PJ, Hornero A, Hernández-Clemente R and Beck PS. 2018. Understanding the temporal dimension of the red-edge spectral region for forest decline detection using high-resolution hyperspectral and Sentinel-2a imagery. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 137:134-148. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2018.01.017>

# Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field

## Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo

Camila Illa<sup>1\*</sup>, Alejandro Andrés Pérez<sup>2</sup>, Matias Torassa<sup>1</sup>, Maria Alejandra Pérez<sup>1</sup>, Centro de Transferencia Calidad Agroalimentaria<sup>1</sup>, Centro de Transferencia de Bioinsumos<sup>2</sup>; Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Félix Marrone 746, 5000, Córdoba, Argentina. \*Autor para correspondencia: camilailla@agro.unc.edu.ar

Recibido: 29 de Octubre, 2019.

Aceptado: 29 de Noviembre, 2019.

Illa C, Pérez AA, Torassa M and Pérez MA. 2020. Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 119-131.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1910-6

Primera publicación DOI: 13 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 13, 2019.

**Resumen.** La producción de maní en Argentina sufre severas fluctuaciones debido principalmente al daño provocado por enfermedades fúngicas; su control con productos sintéticos es ineficiente, siendo el control biológico una alternativa de manejo que contribuiría a la sustentabilidad del sistema de producción. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de biocontrol y promoción de crecimiento en maní al inocular *Trichoderma harzianum* CT306 y *Bacillus subtilis* CT104, en condiciones

**Abstract.** Peanut production in Argentina suffers severe fluctuations, mainly due to fungal diseases and its control with chemical treatments is inefficient, with biological control being a management alternative that would contribute to the sustainability of the production system. This research aimed to evaluate the effect of biocontrol and growth promotion on peanuts by inoculating *Trichoderma harzianum* CT306 and *Bacillus subtilis* CT104 under controlled conditions and field. The tests were carried out in pots with controlled conditions (25 °C, 12 hours light) with peanut seeds Var. Granoleic infected with *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* and *Thecaphora frezzi*. In plants grown to 60 DDS, absence of *A. flavus* and *Fusarium* sp. when applying biological alone and in combination; while the joint application with *T. harzianum* and *Bacillus* caused the absence of *S. minor* and low incidence of *T. frezzi*. In field evaluations, biological treatments increase the emergency percentage (37%) and at

controladas y campo. Los ensayos se realizaron en macetas con condiciones controladas (25 °C, 12 h luz) con semillas de maní Var. Granoleico infectadas con *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* y *Thecaphora frezzi*. En plantas crecidas hasta los 60 DDS, se observó ausencia de *A. flavus* y *Fusarium* sp. al aplicar los biológicos solos y combinados; mientras que la inoculación conjunta de *T. harzianum* y *Bacillus* ocasionó ausencia de *S. minor* y baja incidencia de *T. frezzi*. En las evaluaciones en el campo, los tratamientos con biológicos aumentaron el porcentaje de emergencia (37%) y al final del ciclo se registró reducción del 14% de la incidencia de *T. frezzi*, aumento de biomasa (27%), rendimiento (46%) y tamaño de grano (34%) respecto al testigo, sin afectar el grado de madurez alcanzado.

**Palabras clave:** *Arachis hypogaea*, rendimiento, Agentes de Control Biológico.

La cadena agroindustrial de maní (*Arachis hypogaea*) en Argentina se ubica fundamentalmente en la provincia de Córdoba y actúa como disparador del desarrollo local. Actualmente, en el sistema de producción de maní, se observa una alta presión de enfermedades fúngicas transportadas por la semilla, como el carbón del maní cuyo agente causal es *Thecaphora frezzi* y Tizón del maní ocasionada por *Sclerotinia minor* (INTA, 2018; Rosso *et al.*, 2018). Esto adquiere una implicancia relevante en la planificación del sistema productivo a largo plazo y con importantes efectos a nivel regional. Si bien, la aplicación de fungicidas sintéticos es la principal herramienta para el control de este tipo de enfermedades, es ineficiente y su uso tiene consecuencias controvertidas sobre el ambiente, la salud humana y el equilibrio en la microbiota edáfica (Andrés *et al.*, 2016). Para

the end of the cycle there was a 14% reduction in the incidence of *T. frezzi*, an increase in biomass (27%), yield (46%) and grain size (34%) with respect to the check, without affecting the degree of maturity reached.

**Key words:** *Arachis hypogaea*, yield, Biological Control Agents.

The peanut agroindustry chain (*Arachis hypogaea*) in Argentina is located mainly in Córdoba province and can be considered the enabler of local development. Currently, the peanut production system is under high pressure by seed-transported fungal diseases, including peanut smut, whose causal agent is *Thecaphora frezzi*, and peanut blight caused by *Sclerotinia minor* (INTA, 2018; Rosso *et al.*, 2018). This has relevant implications for the long-term planning of the production system and important effects at the regional level. Although the use of synthetic fungicides has been the main tool for controlling this kind of diseases, it has proven to be ineffective, with controversial consequences for the environment, human health and the balance of edaphic microbiota (Andrés *et al.*, 2016). An alternative has emerged to address these limitations by using biocontrol as part of sustainable crop management in order to improve productivity by increasing the availability of nutrients and phytopathogen protection (Sherathia *et al.*, 2016). The products used for biological control are preparations of living or latent cells of microorganisms that, when applied to the soil or seed, favor the plant-rhizosphere relationship (Bashan *et al.*, 2013). So far, there are *in vitro* studies on peanut about the benefits of applying microorganisms (Ankati *et al.*, 2018; Ganuza *et al.*, 2017). According to Bashan *et al.* (2013), the applied biologicals can directly or indirectly influence

atender a estas limitantes surge como alternativa el biocontrol en el marco de un manejo sustentable de los cultivos, con la finalidad de mejorar la productividad a través del incremento en la disponibilidad de nutrientes y la protección a fitopatógenos (Sherathia *et al.*, 2016). Los productos empleados en el control biológico, son preparaciones de células vivas o latentes de microorganismos que aplicados al suelo o a la semilla, favorecen la relación planta-rizósfera (Bashan *et al.*, 2013). Existen hasta el momento, estudios realizados *in vitro* en maní acerca del beneficio al aplicar microorganismos (Ankati *et al.*, 2018; Ganuza *et al.* 2017). De acuerdo a lo propuesto por Bashan *et al.* (2013) los biológicos aplicados pueden influenciar en forma directa o indirecta sobre el crecimiento vegetal al ejercer control sobre los fitopatógenos y además producir efectos promotores del crecimiento vegetal. *Bacillus* es un género bacteriano de amplia distribución en los agro-sistemas (suelo, agua y planta) debido a su habilidad para formar endosporas y su capacidad para producir metabolitos antimicrobianos y antifúngicos (fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, lipopéptidos cíclicos) (Tejera-Hernández *et al.*, 2011, Villarreal-Delgado *et al.*, 2017). *Bacillus* activa mecanismos de protección en plantas, los cuales incluyen cambios estructurales en la pared celular por acumulación de lignina (Singh *et al.*, 2016) y la producción de flavonoides, fitoalexinas y auxinas (Pretali *et al.*, 2016). En los ensayos realizados por Shifa *et al.* (2016), la aplicación de *B. subtilis* a semillas de maní y al suelo, redujeron significativamente la población de *A. flavus*; mientras que en los granos disminuyó la infección y el contenido de aflatoxina, evidenciando el efecto de *B. subtilis* como agente de control biológico de hongos potenciales generadores de aflatoxinas en maní. *Trichoderma*, es un hongo de amplia distribución, de gran adaptabilidad, fácil reproducción y capacidad antagonista (Sharma y Gothwal, 2017). En particular

plant growth by controlling phytopathogens as well as producing effects that promote plant growth. *Bacillus* is a bacterial genus that is widely distributed in agri-systems (soil, water and plant) because of its ability to form endospores and produce antimicrobial and antifungal metabolites (phenazines, 2,4-diacetylphloroglucinol, cyclic lipopeptides) (Tejera-Hernández *et al.*, 2011, Villarreal-Delgado *et al.*, 2017). *Bacillus* activates protection mechanisms in plants, including structural changes in the cell wall caused by lignin accumulation (Singh *et al.*, 2016) and the production of flavonoids, phytoalexins and auxins (Pretali *et al.*, 2016). In trials conducted by Shifa *et al.* (2016), the results showed that when *B. subtilis* was applied to peanut seed and the soil, the *A. flavus* population decreased significantly, as well as the infection and the aflatoxin content in grain; this showed the effect of *B. subtilis* as a biological control agent of fungi that can produce aflatoxins in peanut. *Trichoderma* is a widely distributed and highly adaptable fungus, of easy reproduction and antagonistic capacity (Sharma and Gothwal, 2017). Particularly in peanut, inoculation with *Trichoderma* promoted plant growth, according to Rojo *et al.* (2017). The proposed objective of this study was to evaluate the biocontrol effect on *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* and *Thecaphora frezzi*, and growth promotion in peanut by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled and field conditions.

The biological controls that were used, *T. harzianum* and *B. subtilis*, were isolated from peanut production plots in Córdoba and identified as CT306 and CT104 strains, respectively; they belong to the collection of Agri-food Quality Transfer Center, Faculty of Agronomy Sciences, National University of Córdoba (FCA UNC). The antagonistic effect of each microorganism was evaluated *in vitro* in

en maní, la inoculación con *Trichoderma* indujo el crecimiento vegetal, de acuerdo a lo propuesto por Rojo *et al.* (2017). Se propone como objetivo de este trabajo evaluar el efecto de biocontrol sobre *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* y *Thecaphora frezzi* y la promoción de crecimiento en maní al inocular *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo.

Los biológicos utilizados *T. harzianum* y *B. subtilis* fueron aislados de lotes de producción de maní de Córdoba e identificados como las cepas CT306 y CT104 respectivamente, y pertenecen a la colección del Centro de Transferencia de Calidad Agroalimentaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba (FCA UNC). El efecto antagonista de cada microorganismo fue evaluado *in vitro* en estudios previos. Se utilizaron semillas de maní Var. Granoleico cosecha 2016/17, provista por la empresa Aceitera General Deheza S.A., General. Deheza, Córdoba, Argentina. En el ensayo en condiciones controladas se evaluó la eficiencia de control de los biológicos en estudio sobre los siguientes patógenos asociados a semillas: *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* y *T. frezzi*. Estos hongos se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Fitopatología, FCA UNC, Argentina. Para la inoculación de las semillas de maní previamente desinfectadas (hipoclorito de sodio 0.3% (v/v) durante 10 minutos y enjuague posterior con agua destilada estéril) con cada fitopatógeno, se lavó superficialmente la placa de cultivo puro con solución salina estéril al 0.9%. La concentración de la suspensión de esporas para *A. flavus* y *Fusarium* sp. fue de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y de  $1 \times 10^5$  esclerocios  $\text{mL}^{-1}$  de *S. minor*. En el caso de *T. frezzi* la inoculación de semillas se realizó recubriéndolas con una suspensión de teliósporas (1 g/25 mL de solución salina estéril). Posteriormente se procedió a la infestación de 100 semillas por peleteo con cada hongo en estudio. El inóculo de *T. harzianum* se obtuvo

previous studies. For the study, peanut seed of the Granoleico variety, 2016/17 harvest cycle, was provided by the company Aceitera General Deheza S.A., General. Deheza, Córdoba, Argentina. A trial under controlled conditions was used to evaluate the control efficiency of the studied biologicals on the following pathogens associated with seeds: *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* and *T. frezzi*. The fungi were obtained from the culture collection of the Phytopathology Laboratory, FCA UNC, Argentina. To inoculate the peanut seeds, which were previously disinfected with 3% (v/v) sodium hypochlorite for 10 min and rinsed with sterile distilled water, the surface of the pure culture plate was washed with a 0.9% sterile saline solution. The concentration of the spore suspension for *A. flavus* and *Fusarium* sp. was  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and  $1 \times 10^5$  sclerotia  $\text{mL}^{-1}$  of *S. minor*. In the case of *T. frezzi*, the seeds were inoculated by applying a coat of teliospore suspension (1 g/25 mL of sterile saline solution). Then, using the pelletizing method, 100 seeds were infested with each one of the studied fungus. The *T. harzianum* inoculum was obtained in a malt extract medium for 7 days at 28 °C and 12-h light cycles. The *B. subtilis* inoculum was prepared in an agar-potato-dextrose medium in a rotary stirrer for 48 h at 25 °C.

The biocontrol of each pathogen with the microorganisms was conducted separately, for which pots 30 cm in diameter were filled with a soil:sand (3:1) substrate, previously sterilized in an autoclave (1 hour; 1 atm.). The pots were kept in a chamber at 25 °C and 12-h light photoperiod. The evaluated treatments were: a) the check (seed infected with the pathogen in sterile substrate); b) inoculation with *T. harzianum* (seed infected with the pathogen in a substrate inoculated with *T. harzianum*  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 1 L  $\text{m}^3$  of substrate); c) inoculation with *B. subtilis* (seed infected with the pathogen and after 24 h inoculated with *B.*

en medio de cultivo de extracto de malta durante 7 días a 28 °C con ciclos de 12 h de luz. Mientras que el de *B. subtilis* fue preparado en medio agar papa dextrosa en agitador rotativo durante 48 h a 25 °C.

El biocontrol de cada patógeno con los microorganismos se llevó a cabo por separado, para lo cual se prepararon macetas de 30 cm de diámetro con sustrato compuesto por tierra: arena (3:1) previamente esterilizado mediante autoclavado (1 hora; 1 atm.). Las macetas se mantuvieron en cámara a 25 °C y fotoperiodo de 12 h de luz. Los tratamientos evaluados fueron: a) Testigo (semilla infectada con patógeno en sustrato estéril); b) inoculación con *T. harzianum* (semilla infectada con patógeno en sustrato inoculado con *T. harzianum*  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 1 L  $\text{m}^3$  de sustrato); c) inoculación con *B. subtilis* (semilla infectada con patógeno y a las 24 h inoculada con *B. subtilis*  $2.5 \times 10^{10}$  UFC en dosis de 100 mL/100 kg de semillas, en sustrato estéril) y d) inoculación combinada con *T. harzianum* y *B. subtilis* (semilla infectada con patógeno y a las 24 h inoculada con *B. subtilis* y *T. harzianum* en las mismas dosis y concentración de los tratamientos anteriores). El ensayo se condujo en un diseño completamente al azar. Cada unidad experimental estuvo constituida por cuatro macetas por duplicados para cada tratamiento evaluado. El ensayo se repitió completo dos veces. Desde la siembra y hasta los 60 DDS (días después de la siembra) se evaluaron los signos y síntomas de cada enfermedad por observación visual, lupa estereoscópica y microscopio óptico, de acuerdo a la descripción presentada en el Cuadro 1. En función del porcentaje de plantas con signos y síntomas de la enfermedad se establecieron las siguientes categorías de incidencia: nivel bajo= 10% de las plantas; nivel medio= 25% de las plantas, nivel alto= 50% de las plantas y ausencia= 0% de las plantas. En todos los casos donde se detectó enfermedad se realizó un aislamiento e identificación morfológica para la confirmación del patógeno.

*subtilis*  $2.5 \times 10^{10}$  UFC using doses of 100 mL/100 kg of seeds, in sterile substrate); and d) inoculation with a combination of *T. harzianum* and *B. subtilis* (seed infected with the pathogen and after 24 h inoculated with *B. subtilis* and *T. harzianum* using the same doses and concentration of the previous treatments). The trial was arranged in a completely randomized design. Each unit of the experiment consisted of four pots per duplicates for each evaluated treatment. The trial was repeated twice. From sowing and up to 60 DAS (days after sowing), the signs and symptoms of each disease were observed, visually and with a stereoscope and an optical microscope, according to the description shown in Table 1. Based on the percentage of plants showing disease signs and symptoms, the following incidence categories were established: low level= 10% of plants; intermediate level= 25% of plants; high level= 50% of plants; no signs or symptoms= 0% of plants. In all cases where the disease was detected, isolation and morphological identification were conducted to confirm the pathogen.

In the field, the seeds were sown in the Peanut Module of the FCA UNC Field-School (31° 28' 49.42" S and 64° 00' 36.04" W), Córdoba, Argentina. The evaluated treatments were: a) control (untreated seed); b) fungicide (pre-treatment with Metalaxil-M 1.0 g/Fludioxonil 2.5 g; 750 cc/100 kg seed); c) fungicide + *T. harzianum* (pre-treatment with fungicide + pre-inoculation with *T. harzianum*  $1 \times 10^8$  viable conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 200 mL/100 kg seed + adhesive); d) fungicide + *B. subtilis* (pre-treatment with fungicide + pre-inoculation with *B. subtilis* ( $2.5 \times 10^{10}$  UFC/L; 100 mL/100 kg seed); and e) fungicide + *T. harzianum* + *B. subtilis* (pre-treatment with fungicide + pre-inoculation with *T. harzianum* and *B. subtilis* at the same dose and concentration as in the previous treatments). Each treatment was sown rows 100 m long separated by a distance of 70 cm and a distribution of 14 seeds per linear meter. Each treatment was arranged in a completely

**Cuadro 1. Descripción de signos y síntomas tenidos en cuenta para la categorización de plantas enfermas de maní en condiciones controladas**  
**Table 1. Description of the signs and symptoms to classify infected peanut plants under controlled conditions.**

| Enfermedad                | Signos y síntomas                                                                                                                                         |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> | A la emergencia lesiones necróticas en cotiledones. Presencia de micelio en la unión de cotiledones con hipocótilo.                                       |
| <i>Fusarium</i> sp.       | Marchitamiento de rama principal y hojas.<br>Manchas oscuras en raíz principal con presencia de micelio y macroconidios en área vascular.                 |
| <i>Sclerotinia minor</i>  | Pérdida de turgencia de ramas y hojas.<br>Presencia de micelio algodonoso pulverulento en la base de la planta. Presencia de esclerocios negros pequeños. |
| <i>Thecaphora frezzi</i>  | Presencia de micelio dicariótico en ginóforos.                                                                                                            |

En el campo, la siembra se realizó en el Módulo Maní del Campo Escuela de la FCA UNC (31° 28 49.42" S y 64° 00 36.04" O) Córdoba, Argentina. Los tratamientos evaluados fueron: a) Testigo (semilla sin tratamiento); b) Fungicida (Pretratado con Metalaxil-M 1.0 g/Fludioxonil 2.5 g; 750 cc/100 kg semilla); c) Fungicida + *T. harzianum* (Pretratado con fungicida + Preinoculación con *T. harzianum* 1 x 10<sup>8</sup> conidios viables mL<sup>-1</sup>; 200 mL/100 kg semilla + adherente); d) Fungicida + *B. subtilis* (Pretratado con fungicida + Preinoculación con *B. subtilis* (2.5 x 10<sup>10</sup> UFC/L; 100 mL/100 kg semilla); e) Fungicida + *T. harzianum* + *B. subtilis* (Pretratado con fungicida + Preinoculación con *T. harzianum* y *B. subtilis* en las mismas dosis y concentración de los tratamientos anteriores). Se sembraron cuatro surcos de 100 m de longitud para cada tratamiento distanciados entre ellos 70 cm, con una distribución de 14 semillas por metro lineal. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Los datos fueron relevados de acuerdo a un muestreo aleatorio sobre los dos surcos centrales de todas las plantas en 1 m<sup>2</sup>. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de plantas emergidas a los 28 DDS, crecimiento de plantas medido como peso seco (PS) a los 30 y 165 DDS (Pérez y Arguello, 1995). Al final del ciclo

randomized design with four replications. The data were collected by randomly sampling all the plants from the two central rows in 1 m<sup>2</sup>. The evaluated variables were percentage of emerged plants at 28 DAS, plant growth measured as dry weight (DW) at 30 and 165 DAS (Pérez and Arguello, 1995). At the end of the cycle (165 DAS), each replication of each treatment was manually harvested to determine the level of maturity, according to the husk scraping method (Pérez *et al.*, 2004), percentage of husks infected with *T. frezzi* (March and Marinelli, 2005), husk and grain yield (qq/ha) and grain quality as the percentage of confectionery grains corresponding to 38/42, 40/50, 50/60 and 60/70 grains per ounce. The data were subjected to an analysis of variance (ANOVA), after validating the variance homogeneity assumption using Levene's test ( $\alpha = 0.05$ ). The means were compared using the LSD test ( $p \leq 0.05$ ) with the InfoStat statistical software (Di Rienzo *et al.*, 2018).

According to the results shown in Table 2, under controlled conditions the treatments with *T. harzianum* and *B. subtilis*, alone and combined, showed no *Fusarium* sp., while *S. minor* showed a low level of incidence when the antagonist was individually applied, and no disease symptoms were observed when the treatments were



(165 DDS) se procedió a la cosecha manual de cada repetición en cada tratamiento para poder determinar: grado de madurez de acuerdo al método de raspado de vaina (Pérez *et al.*, 2004), porcentaje de infección de vainas con *T. frezzi* (March y Marinelli, 2005), rendimiento de vainas y granos (qq/ha) y calidad granométrica como porcentaje de granos confitería correspondientes a 38/42, 40/50, 50/60 y 60/70 granos por onza. Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), previa validación del supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene ( $\alpha = 0.05$ ). La comparación de medias se realizó mediante test LSD ( $p \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018).

De acuerdo a los resultados presentados en el Cuadro 2, en condiciones controladas los tratamientos con *T. harzianum* y *B. subtilis* de forma individual y combinados, mostraron ausencia de *Fusarium* sp., mientras que *S. minor* mostró nivel de incidencia bajo con la aplicación de los antagonista de forma individual y ausencia de la enfermedad al inocularlos de manera combinada. El control

combined. The *T. frezzi* control was more effective when the biocontrols were combined (Table 2). However, when the biocontrols were applied alone, *T. harzianum* had better control than *B. subtilis*. These results coincide with the results of Rojo *et al.* (2007), who by applying *T. harzianum* ITEM 3636 on peanut seeds effectively controlled *F. solani*. The authors state that this biocontrol proved to be an efficient and competitive microorganism in the rhizosphere. The effect observed when *Trichoderma* is used could be related to complex mechanisms possibly associated with the degradation of the fungal walls, according to Howell (2003), Harman *et al.* (2004) and Woo *et al.* (2006).

Preliminary evaluations in which peanut was inoculated with *B. subtilis* showed effective control of fungi associated with seed (Illa *et al.*, 2013). In the results shown in Table 2, it must be highlighted that the growth of the *A. flavus* fungus was inhibited when *B. subtilis* was inoculated in peanut. Similar results were obtained by Shifa *et al.* (2016), who reported they inhibited the growth of *A. flavus* by 93-100% in dual crop trials and reduced the

**Cuadro 2. Nivel de incidencia de hongos fitopatogénicos en maní en ensayos en condiciones controladas.**  
**Table 2. Level of incidence of phytopathogenic fungi in peanut trials under controlled conditions.**

| Tratamientos                                     | Hongos fitopatogénicos |                 |                 |                  |
|--------------------------------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
|                                                  | <i>A. flavus</i>       | <i>Fusarium</i> | <i>S. minor</i> | <i>T. frezzi</i> |
| Testigo semilla infectada en sustrato estéril    | XXX                    | XXX             | XXX             | XXX              |
| <i>Trichoderma</i> en sustrato                   | -                      | -               | X               | X                |
| <i>Bacillus</i> en semilla                       | -                      | -               | X               | XX               |
| <i>Trich.</i> + <i>Bacillus</i> sustrato semilla | -                      | -               | -               | X                |

Nivel de incidencia Bajo: X (10% plantas); Medio: XX (25% plantas); Alto: XXX (50% plantas); Ausencia: -(0% plantas) / Level of incidence Low: X (10% of plants); Intermediate: XX (25% of plants); High: XXX (50% of plants); No fungi: - (0% of plants).

de *T. frezzi* fue más eficiente al aplicar los biocontroladores de manera combinada (Cuadro 2). Sin embargo, al aplicarlos de manera individual se observó que *T. harzianum* presentó mejor control que *B. subtilis*. Estos resultados coinciden con lo observado por Rojo *et al.* (2007) quienes al aplicar *T. harzianum* ITEM 3636 en semillas de maní, lograron un efectivo control de *F. solani*. Estos autores sostienen que el biológico incorporado resultó ser un microorganismo eficiente y competitivo en la rizósfera. El efecto registrado al aplicar *Trichoderma* estaría relacionado a complejos mecanismos posiblemente asociados a la degradación de las paredes del hongo de acuerdo a lo propuesto por Howell (2003), Harman *et al.* (2004) y Woo *et al.* (2006).

En maní, evaluaciones preliminares inoculando *B. subtilis*, demostraron un eficiente control de hongos asociados a semillas (Illa *et al.*, 2013). En los resultados presentados en el Cuadro 2, se debe destacar la inhibición del crecimiento del hongo *A. flavus* por la inoculación con *B. subtilis* en maní. Resultados similares fueron encontrados por Shifa *et al.* (2016) quienes reportaron inhibición del crecimiento de *A. flavus* del 93 al 100% en ensayos de cultivo dual y la disminución en los porcentajes de infección en ensayos de invernáculo y campo. Estos autores resaltan la importancia de la aplicación de *Bacillus* para lograr disminuir la presencia de este hongo potencial generador de aflatoxina, lo que representa un aporte a la producción de maní inocuo.

En los ensayos de campo la emergencia de plantas a los 28 DDS (Cuadro 3) para todos los tratamientos aplicados, fue mayor respecto al Testigo ( $p \leq 0.05$ ). Los tratamientos que incluyeron productos biológicos, mejoraron el porcentaje de plantas emergidas respecto al tratamiento fungicida, sin diferencias significativas entre los productos biológicos ensayados. El incremento de la emergencia en los tratamientos con biológicos pudo deberse al control de hongos fitopatógenos asociados a las

infection percentages in greenhouse and field trials. The authors highlight the importance of applying *Bacillus* to be able to reduce the presence of this fungus that can produce aflatoxins, which contributes to safe peanut production.

In field trials, the emergence of plants at 28 DAS (Table 3) in all the applied treatments was higher than that of the control ( $p \leq 0.05$ ). The treatments that included biological treatments improved the percentage of emerged plants compared to that of the fungicide treatment, with no significant differences between the biological products used. The increase in emergence in the biological treatments could be due to the control of phytopathogenic fungi associated with peanut seed. In this regard, Marani-Barbosa *et al.* (2013) informed that by efficiently controlling *A. flavus* transported on the seed, they improved peanut seedling emergence in the field. Results in which a better effect was obtained by applying a combination of a biological and a fungicide, compared to the effect obtained when applied alone, have been already described for *Bacillus* (Illa *et al.*, 2013; 2016) and *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008). The plant growth measured at 30 DAS (Table 3) indicated that all the treatments with biological products were better than the control ( $p \leq 0.05$ ). In addition, no significant differences were detected between the treatment with fungicide and the evaluated biocontrols. At 165 DAS, the positive effect of the applied biologicals, alone and combined, was observed and was statistically different from the fungicide treatment. So, the application of biologicals improved plant growth by 11.8% compared to the fungicide treatment, and by 27.4% compared to the control. The average value of mature husks was 29%, with no significant differences between the evaluated treatments (Table 3). Based on the obtained results, we can conclude that the maturity index behaved independently from the sanitary status of the husks and the application of the biocontrols.

**Cuadro 3. Emergencia, crecimiento de plantas y estado de madurez en maní como respuesta a diferentes tratamientos combinados de *Trichoderma*, *Bacillus* y Fungicida aplicados en semillas.****Table 3. Emergence, growth and maturity of peanut plants in response to different combined treatments of *Trichoderma*, *Bacillus* and fungicide applied to seed.**

| Tratamiento                             | Emergencia (%) | Crecimiento de plantas |                        | Madurez (%) |
|-----------------------------------------|----------------|------------------------|------------------------|-------------|
|                                         |                | 30 DDS<br>mg PS/planta | 165 DDS<br>g PS/planta |             |
| Testigo                                 | 50 c           | 116 b                  | 472 c                  | 30 a        |
| Fungicida                               | 70 b           | 130 a                  | 573 b                  | 27 a        |
| Fungicida + <i>Bacillus</i>             | 90 a           | 155 a                  | 630 a                  | 31 a        |
| Fungicida + <i>Trichoderma</i>          | 80 a           | 147 a                  | 641 a                  | 29 a        |
| Fungicida + <i>Bac.</i> + <i>Trich.</i> | 90 a           | 160 a                  | 680 a                  | 27 a        |

Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican diferencias no significativas LSD  $p \leq 0.05$  / Each value represents the average of four replications. Equal letters indicate no significant differences LSD  $p \leq 0.05$ .

semillas de maní. Al respecto, Marani-Barbosa *et al.* (2013) informaron que el control eficiente de *A. flavus* transportado por la semilla, mejoró la emergencia de las plántulas de maní en el campo. Resultados detectados con mejor efecto al aplicar de manera combinada un biológico más fungicida que de forma individual ya fue relatada tanto para *Bacillus* (Illa *et al.*, 2013; 2016) como para *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008). El crecimiento de plantas medido a los 30 DDS (Cuadro 3), mostró que todos los tratamientos con productos biológicos superaron al Testigo ( $p \leq 0.05$ ). Además, no se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento con el fungicida y los de los biocontroladores evaluados. Mientras que a los 165 DDS, se observó el efecto positivo de los biológicos aplicados solos y combinados, presentando diferencia estadística al tratamiento fungicida. Así la aplicación de biológicos mejoró el crecimiento en 11.8% respecto al tratamiento fungicida y 27.4% en relación al Testigo. El valor promedio de vainas maduras fue del 29%, sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 3). De lo expuesto se deduce

Based on the results shown in Table 4, the husk and grain yields were higher in all the treatments compared to that of the control. In addition, the application of biologicals, alone and combined, increased grain yields by 45.2% compared to those of the control, and by 9.4% compared to the fungicide treatment. These results coincide with the results obtained by Shifa *et al.* (2016), who reported that when applying *Bacillus* and fungicide (Tebuconazole) to peanut seeds, there was an increase of around 40% in husk yield. The percentage of grains of confectionary quality (Table 4) did not show significant differences among the treatments applied to the seeds, but it did with the control. The yield increase appears to be a consequence of the growth promoter effect of the applied biologicals (Rojo *et al.*, 2007). In this regard, previous studies have shown that there is a positive correlation between the growth achieved by a peanut plant and its yield (Prasad *et al.*, 2009). The percentage of *T. frezzi* incidence on the husks was not significantly different between the control and the fungicide treatment (Table 4). This

que el índice de madurez se comportó de manera independiente al estado sanitario de las vainas y la aplicación de los biocontroladores.

En base a los resultados presentados en el Cuadro 4, el rendimiento de vainas y granos fue mayor en todos los tratamientos respecto al Testigo. Además, la aplicación de los biológicos solos y combinados logró aumentar los rendimientos en grano en un 45.2% respecto al Testigo y 9.4% al compararlo con el tratamiento fungicida. Estos resultados concuerdan con Shifa *et al.* (2016), quienes reportaron que al aplicar *Bacillus* más fungicida (Tebuconazole) en semillas de maní ocasionó un incremento de alrededor del 40% en el rendimiento de vainas. El porcentaje de granos de calidad confitería (Cuadro 4) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a las semillas, pero sí con respecto al Testigo. El incremento en los rendimientos aparece como consecuencia del efecto promotor del crecimiento por los biológicos aplicados (Rojo *et al.*, 2007). En relación a ello, estudios llevados a cabo han demostrado que existe una correlación positiva entre el crecimiento alcanzado por la planta de maní y el rendimiento (Prasad *et al.*, 2009). El porcentaje de incidencia de *T. frezzi* en vainas no fue significativamente diferente entre el Testigo y el tratamiento Fungicida (Cuadro 4). Esto demostró

fact demonstrated that the synthetic product did not control the disease, in contrast with what Astiz and Wojscko (2011) observed *in vitro*, and Buffoni and Marraro (2010) in Colorado peanut in field trials. It must be highlighted that controlling this disease is relevant because of the important losses it causes and its potential spread to new crop areas (Ganuza *et al.*, 2017). The treatments with *B. subtilis* and *T. harzianum* that were applied, alone and combined, did not show significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between them, but they did when compared to the control and the fungicide treatment. The results obtained when biocontrols were applied show a decrease in *T. frezzi* incidence. This coincides with the results obtained by Ganuza *et al.* (2017), who evaluated peanut seeds inoculated with *T. harzianum* ITEM 3636, and controlled *T. frezzi* by 17% and 25%, depending on the evaluated year.

It is important to highlight that pre-treating seed with biologicals is an alternative for controlling this severe disease that reduces yields more than 30%, making peanut production economically non-viable (Paredes *et al.*, 2017). The results of this study show that there are benefits when applying *B. subtilis* and *T. harzianum* to peanut, from the phytosanitary perspective and for increasing yield. It should also be noted that numerous studies have

**Cuadro 4. Rendimiento de vainas y granos e incidencia de *T. frezzi* en maní, con diferentes tratamientos combinados de *Trichoderma*, *Bacillus* y Fungicida aplicados en semillas.**

**Table 4. Husk and grain yield and incidence of *T. frezzi* in peanut, with different combined treatments of *Trichoderma*, *Bacillus* and fungicide applied to seeds.**

| Tratamiento                            | Rendimiento vainas<br>qq/ha | Rendimiento granos<br>qq/ha | Granos confitería<br>% | Incidencia <i>T. frezzi</i><br>% |
|----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Testigo                                | 37.8 c                      | 25.7 c                      | 39.5 b                 | 28.3a                            |
| Fungicida                              | 62.5 b                      | 42.5 b                      | 59.4 a                 | 30 a                             |
| Fungicida + <i>Bacillus</i>            | 65.1 a                      | 47.3 a                      | 61.2 a                 | 15.3 b                           |
| Fungicida + <i>Trichoderma</i>         | 64.9 a                      | 45.5 a                      | 60.9 a                 | 17.5 b                           |
| Fungicida + <i>Bac.</i> + <i>Trich</i> | 68.3 a                      | 47.9 a                      | 59.8 a                 | 12.7 b                           |

Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican diferencias no significativas LSD  $p \leq 0.05$  / Each value represents the average of four replications. Equal letters indicate no significant differences LSD  $p \leq 0.05$ .

que el producto sintético no controló la enfermedad en contraposición a lo propuesto por Astiz y Wójccko (2011) *in vitro* y Buffoni y Marraro (2010) en maní Colorado en ensayos de campo. Es de destacar que el control de esta enfermedad se vuelve relevante debido a las importantes pérdidas ocasionadas y su posible expansión hacia nuevas áreas de cultivo (Ganuza *et al.*, 2017). Por su parte, los tratamientos con *B. subtilis* y *T. harzianum* aplicados de forma individual y combinados, no mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre ellos pero sí al compararlos con el Testigo y el tratamiento con Fungicida. Los resultados obtenidos al aplicar biocontroladores muestran una disminución en la incidencia de *T. frezzi*. Esto concuerda con lo informado por Ganuza *et al.* (2017) al evaluar semillas de maní inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636, quienes observaron un control de 17% y 25% de *T. frezzi*, dependiendo del año evaluado.

Es importante destacar que el pretratamiento de semillas con biológicos, se constituiría en una alternativa a considerar para el control de esta severa enfermedad que disminuye en más del 30% el rendimiento, haciendo inviable económicamente la producción (Paredes *et al.*, 2017). Los resultados de este estudio demuestran que hay beneficios al aplicar *B. subtilis* y *T. harzianum* en maní, desde el punto de vista sanitario como en el incremento del rendimiento. Además, se debe tener en cuenta que numerosos estudios han demostrado la inocuidad de estos microorganismos y que no existen restricciones en los códigos alimentarios al registrar su presencia en granos. La inoculación con *T. harzianum* y *B. subtilis* en condiciones controladas mostró la actividad antifúngica sobre los patógenos *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* y *T. frezzi* en plantas de maní a los 60 DDS. El mejor control se logró con la aplicación combinada de los biológicos evaluados. En los ensayos de campo, la aplicación de los productos biológicos solos y combinados,

shown that these microorganisms are safe and that there are no restrictions in the food codes when their presence is detected on grains. Inoculation with *T. harzianum* and *B. subtilis* under controlled conditions showed antifungal activity on the pathogens *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* and *T. frezzi* in peanut plants at 60 DAS. The best control was achieved when the evaluated biologicals were combined. In field trials, the application of biological products, alone and combined, improved emergence at 28 DAS and plant growth at 165 DAS. This resulted in higher husk and grain yield, increase in the proportion of bigger grains, without affecting the maturity level. At the end of the cycle, the application of the evaluated biologicals reduced *T. frezzi* incidence by 14% compared with the control and the fungicide. The biocontrolling and stimulating effect of *T. harzianum* and *B. subtilis* on peanut growth suggests that their application will benefit the crop and can be considered a technological strategy to be added during sowing.

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

mejoró la emergencia a los 28 DDS y el crecimiento de las plantas a los 165 DDS. Esto resultó en mayor rendimiento de vainas y granos, aumento de la proporción de granos con mayor tamaño sin afectar el grado de madurez. Al final del ciclo, las aplicaciones de biológicos evaluadas disminuyeron un 14% la incidencia de *T. frezzi*, respecto al Testigo y al fungicida. El efecto biocontrolador y estimulante de *T. harzianum* y *B. subtilis* en el crecimiento del maní, sugiere que su aplicación resultaría beneficiosa al cultivo y puede considerarse como estrategia tecnológica para adicionar al momento de la siembra.

LITERATURA CITADA

- Andrés JA, Pastor NA, Ganuza M, Rovera M, Reynoso MM and Torres A. 2016. Biopesticidas: An Eco-Friendly Approach for the Control of Soil borne Pathogens in Peanut. In: Singh *et al.* (Eds.) Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity. Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_9
- Ankati S, Swaroopa Rani T and Podile A. 2018. Partner-triggered proteome changes in the cell wall of *Bacillus sonorensis* and roots of groundnut benefit each other. Microbiological Research. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.003>
- Astiz GMM y Wojszko A. 2011. Evaluación *in vitro* de fungicidas curasemillas para el control químico del carbón de maní (*Thecaphora frezii*). XXV Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Córdoba, Argentina. <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2026/Microsoft%20Word%20-%2021Astiz%20-%20Wojszko%20-%20Nova%20-%20Poster.pdf> (consulta, mayo 2019).
- Bashan Y, De-Bashan LE, Prabhu SR and Hernandez JP. 2013. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil 378:1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Buffoni A y Marraro F. 2010. Evaluación de fungicidas curasemillas y su efecto en el carbón del maní causado por *Thecaphora frezii*. XXVI Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Córdoba, Argentina. <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2025/4-MARR~1.PDF> (consulta, mayo 2019).
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M y Robledo CW. 2018. InfoStat versión 2018. [Software de cómputo]. Córdoba, Argentina, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/>
- Ganuza M, Pastor N, Erazo J, Andrés J, Reynoso MM, Rovera M and Torres AM. 2017. Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanuts nut, an emergent disease caused by *Thecaphora frezii*. Eur J Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1360-0>
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M. 2004. Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2, 43. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Howell CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4-10. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Illa C, Cuggino S, Kopp S, Sebastián y Pérez M, Ulliarde A y Pérez MA. 2013. Efecto de la aplicación combinada de *B. subtilis* más fungicidas sobre la calidad fitosanitaria de semillas de maní y el crecimiento posterior de las plantas. XXVIII Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Córdoba, Argentina. Recuperado de: <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2028/4-%20ILLA.pdf> (consulta, junio 2019)
- Illa C, Kopp S, Olivo A y Pérez MA. 2016. Efecto de tratamientos profesionales de fungicidas, polímeros, inoculantes y *Bacillus subtilis* aplicados en semillas de maní sobre el comportamiento a campo desde emergencia hasta cosecha. Jornada Nacional de Maní. Recuperado de: <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA>.
- INTA. 2018. La enfermedad del carbón amenaza al maní cordobés <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=42494> (consulta, mayo 2019)
- Marani-Barbosa R, Faria dos Santos J, Mendonça Lopes M, Cássia Panizzi R and Daiton Vieira R. 2013. Chemical control of pathogens and the physiological performance of peanut seeds. Journal of Food, Agriculture & Environment 11(2): 322-326. https://www.researchgate.net/publication/242149973_Chemical_control_of_pathogens_and_the_physiological_performance_of_peanut_seeds (consulta, mayo 2019)
- March GJ y Marinelli AD. 2005. Enfermedades del Maní en Argentina. 1 ed. Fundación Maní Argentino. 142 pp.
- Paredes JA, Cazón LI, Osella A, Peralta V, Alcalde M, Kearney MI, Zuza MS, Rago AM y Oddino C. 2017. Relevamiento regional del carbón del maní y estimaciones de pérdidas producidas por la enfermedad. XXXII Jornada Nacional de Maní. Gral Cabrera [ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2026/Microsoft%20Word%20-%2021Astiz%20-%20Wojszko%20-%20Nova%20-%20Poster.pdf](http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2026/Microsoft%20Word%20-%2021Astiz%20-%20Wojszko%20-%20Nova%20-%20Poster.pdf) (consulta, mayo 2019)
- Pérez MA, Cavallo AR y Pedelini R. 2004. Indicadores de madurez en frutos de maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Florman, para la producción de semillas en la provincia de Córdoba. Agriscientia 21 (2):77-83. <file:///C:/Users/mani/Downloads/2670-Texto%20del%20art%C3%ADculo-8820-1-10-20120823.pdf> (consulta, junio 2019)
- Pérez, A and Arguello JA. 1995. Deterioration in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds under natural and accelerated aging. Seed Science & Technology 23: 439-445.
- Prasad, PVV, Kakani, VG and Upadhyaya HD. 2009. Growth and production of groundnuts. In W. H. Verheye (Ed.), Soils, Plant Growth and Crop Production pp. 138-167. Oxford: Encyclopedia of Life Support Systems. Eolss Publishers.
- Pretali L, Bernardo L, Butterfield TS, Trevisan M. and Lucini L. 2016. Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced Systemic Response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. Phytochemistry 130: 56-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04.002>
- Rojo FG, Reynoso MM, Ferez M, Chulze SN and Torres AM. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solanica* using peanut brown root rot under field conditions. Crop Protection 26: 549-555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.006>
- Rosso M, Bressano M, De Blas F, Buteler M, Soave J, Soave S, Giordano F, Giuggia J, Lupano G, Moresi A, Seijo G y Oddino C. 2018. Comportamiento de una población de líneas recombinantes endocriadas (RILs) frente a tizón del maní causado por *Sclerotinia minor*. XXXIII Jornada del Maní. [http://ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2033/18.-%20COMPORTAMIENTO%20DE%20UNA%20POBLACION%20DE%20LINEAS%20RECOMBINANTES%20ENDOCRIDADAS%20\(RILS\)%20FRENTE%20A%20TIZ%C3%93N%20DEL%20MANI%20CAUSADO%20POR%20Sclerotinia%20minor.pdf](http://ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2033/18.-%20COMPORTAMIENTO%20DE%20UNA%20POBLACION%20DE%20LINEAS%20RECOMBINANTES%20ENDOCRIDADAS%20(RILS)%20FRENTE%20A%20TIZ%C3%93N%20DEL%20MANI%20CAUSADO%20POR%20Sclerotinia%20minor.pdf) (consulta, junio 2019)

- Sharma PK and Gothalwal R. 2017. *Trichoderma*: A potent fungus as biological control agent. Pp:113-125. In: Singh J., Seneviratne G. (eds) *Agro-Environmental Sustainability*. Springer, Cham. https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2_6
- Sherathia D, Dey R, Thomas M, Dalsania T, Savsani K and Pal KK. 2016. Biochemical and molecular characterization of DAPG-producing plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Legume Research* 39 (4): 614-622. <https://doi.org/10.18805/lr.v0iOF.9389>
- Shifa H, Tasneem S, Gopalakrishnan C and Velazhahan R. 2016. Biological control of pre-harvest aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Bacillus subtilis* G1, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1160642>
- Singh UB, Malvivya D, Singh S, Imran M, Pathak N, Alam M, Rai JP, Singh RK, Sarma BK, Sharma PK and Sharma AK. 2016. Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Soil Ecology* 108: 300-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.014>
- Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM y Heydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos patógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 42: 131-138. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf> (consulta, mayo 2019)
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA and Estrada-Alvarado MI. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Vinale F, Sivasithamparan K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbeti MJ, Li H, Woo SL and Lorito M. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathology* 7: 80-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Woo SL, Scala F, Ruocco M and Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. *Phytopathology* 96: 181-185. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>

Spatial analysis of anthracnose in avocado cultivation in the State of Mexico

Análisis espacial de antracnosis en el cultivo de aguacate en el Estado de México

Atenas Tapia-Rodríguez, José Francisco Ramírez-Dávila, Dulce Karen Figueroa-Figueroa, Martha Lidya Salgado-Siclan, Rodolfo Serrato-Cuevas, Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Campus El Cerrillo, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5, Piedras Blancas, 50200 Toluca de Lerdo, México. Autor para correspondencia: jframirezd@uaemex.mx.

Recibido: 02 de Noviembre, 2019.

Aceptado: 02 de Diciembre, 2019.

Tapia-Rodríguez A, Ramírez-Dávila JF, Figueroa-Figueroa DK, Salgado-Siclan ML and Serrato-Cuevas R. 2020. Spatial analysis of anthracnose in avocado cultivation in the State of Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 132-145.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-1

Primera publicación DOI: 13 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 13, 2019.

Resumen. El presente estudio contribuye al conocimiento de la distribución espacial de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en huertos de aguacate en el Estado de México. El estudio se llevó a cabo en los municipios de Coatepec Harinas, Tenancingo, Donato Guerra y Temascaltepec. Se usaron métodos geoestadísticos para determinar la distribución espacial de la antracnosis. Los muestreos se realizaron quincenalmente durante los meses de julio a diciembre del 2018. Seleccionando aleatoriamente 200 árboles por municipio, éstos se georreferenciaron geográficamente utilizando un

Abstract. The present study contributes to the knowledge of the spatial distribution of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in avocado orchards in the State of Mexico. The study was carried out in the municipalities of Coatepec Harinas, Tenancingo, Donato Guerra and Temascaltepec. Geostatistical methods were used to determine the spatial distribution of anthracnose. Samples were conducted biweekly during the months of July to December 2018. By randomly selecting 200 trees per municipality, they were geographically geo-referenced using a Trimble eTrex model navigator. The spatial distribution of anthracnose in avocado cultivation showed differences in each of the municipalities evaluated, adjusting to different geostatistical models (Gaussian, spherical and exponential), which were validated by the cross-validation method. The spatial distribution of anthracnose was obtained with maps drawn up through ordinary kriging. These maps revealed that the municipality of Tenancingo had the highest anthracnose density, compared to the municipalities of Coatepec

navegador Trimble modelo eTrex. La distribución espacial de la antracnosis en el cultivo de aguacate mostró diferencias en cada uno de los municipios evaluados, ajustándose a diferentes modelos geostatísticos (gaussiano, esférico y exponencial), mismos que fueron validados mediante el método de validación cruzada. La distribución espacial de la antracnosis se obtuvo con mapas elaborados a través del krigeado ordinario. Estos mapas revelaron que el municipio de Tenancingo presentó la mayor densidad de antracnosis, respecto a los municipios de Coatepec Harinas, Temascaltepec y Donato Guerra. La distribución espacial de la antracnosis en los cuatro municipios presento agregación y focos de infección localizados. En este estudio se concluye que los métodos geoestadísticos son una alternativa para mejorar los programas de manejo de enfermedades como la antracnosis y ayudan conducir de manera adecuada el control.

Palabras clave: *Persea americana*, *Colletotrichum gloeosporioides*, semivariograma

En México, uno de los cultivos agrícolas más importantes económicamente es el aguacate (*Persea americana*). En los últimos años, el número de hectáreas plantadas de este cultivo ha incrementado de manera considerable (231,028 ha) (SIAP, 2018); la producción de aguacate en el país se concentra principalmente en el estado de Michoacán, siendo reconocido como el mayor productor y exportador a nivel nacional, seguido de los estados Jalisco, Nayarit y el Estado de México, cuya producción de este último se centra particularmente en los municipios de Coatepec Harinas, Temascaltepec, Tenancingo, Villa de Allende, Donato Guerra y recientemente, en el municipio de Ocuilan (SENASICA, 2019).

El aguacate es uno de los productos que México exporta al mundo; cada día, la demanda comercial

Harinas, Temascaltepec and Donato Guerra. The spatial distribution of anthracnose in the four municipalities presented aggregation and localized sources of infection. This study concludes that geostatistical methods are an alternative to improve disease management programs such as anthracnose and help to adequately conduct control.

Key words: *Persea americana*, *Colletotrichum gloeosporioides*, semivariogram

One of the most important crops in Mexico, in economic terms, is avocado (*Persea americana*). In recent years, the number of hectares planted with this crop has increased considerably (231,028 ha) (SIAP, 2018); the avocado production in the country is focused mainly in the state of Michoacán, which is known as the main producing and exporting region in the country, followed by the states of Jalisco, Nayarit and the State of Mexico, the latter having a production focused mainly on the municipalities of Coatepec Harinas, Temascaltepec, Tenancingo, Villa de Allende, Donato Guerra, and recently, Ocuilan (SENASICA, 2019).

Avocado is one of the products that Mexico exports to the rest of the world, and the international commercial demand for this fruit is growing every day, which requires high quality standards in production. Phytosanitary management and control aspects have become one of the main concerns for the avocado production sector, since pests and diseases found in orchards have limited the quality of the fruits and their commercialization (Orozco *et al.*, 2017). One of the phytosanitary problems that limit avocado production is anthracnose, one of the most frequent diseases, particularly in post-harvest (Maeda, 2014). The symptoms of this disease are caused by species of phytopathogenic fungi of the deuteromycetes or fungi imperfecti, and mostly by those belonging to the genus *Colletotrichum*

de este frutal a nivel internacional es mayor, por lo que se busca que la producción sea de calidad; aspectos de manejo y control fitosanitarios se han convertido en una de las principales preocupaciones para el sector productivo aguacatero; plagas y enfermedades que se presentan en los huertos han limitado considerablemente la calidad de los frutos y su comercialización (Orozco *et al.*, 2017). Uno de estos problemas fitosanitarios que limitan la producción de aguacate es la antracnosis, una de las enfermedades que se presenta con mayor frecuencia, sobretodo en poscosecha (Maeda, 2014). Los síntomas de esta enfermedad son causados por especies de hongos fitopatógenos del grupo de los deuteromicetes u hongos imperfectos, principalmente, por las pertenecientes al género *Colletotrichum* (anamorfo), como *C. hymenocallidis* y *C. siamense*, mismas que han sido recientemente reconocidas como causantes de antracnosis en el cultivo de aguacate (Trinidad, 2017), sin embargo, la especie que es considerada altamente patógena para este cultivo es *Colletotrichum gloeosporioides* (Rojo-Báez *et al.*, 2017).

Se ha documentado ampliamente a *C. gloeosporioides* como un hongo fitopatógeno que permanece en estado de latencia en los huertos de aguacate, esperando condiciones ambientales propicias para su desarrollo y dispersión, tales como humedad relativa arriba del 90% y temperatura por debajo de los 29 °C (Basulto *et al.*, 2011). Algunos de los síntomas característicos que se presentan en las hojas, flores y frutos suelen ser marchitez de puntas, clavo o viruela, sarampión, entre otros, generando, a su vez, manchas irregulares de tonalidades salmonadas que posteriormente se tornan grisáceas, marrones o negras debido a la presencia de apresorios, acérvulos y conidios (Maeda, 2014).

Kermack y McKendric (1927) son reconocidos en la ciencia por sus aportes significativos a la Epidemiología, cuyos trabajos llevaron a la comprensión

(anamorfo), such as *C. hymenocallidis* and *C. siamense*, which have recently been known to cause anthracnosis in avocado crops (Trinidad, 2017). However, the species considered to be highly pathogenic for this crop is *Colletotrichum gloeosporioides* (Rojo-Báez *et al.*, 2017).

Colletotrichum gloeosporioides has been widely documented as a phytopathogen that remains in a state of latency in avocado orchards, waiting for adequate conditions for its development and dispersal, such as a relative humidity above 90% and a temperature below 29 °C (Basulto *et al.*, 2011). Some of the characteristic symptoms that appear on leaves, flowers and fruits are usually wilted tips, clove or smallpox, measles, and others, producing, in turn, irregular, salmon-colored spots that later turn grayish, maroon or black due to the presence of apresories, acervuli and conidia (Maeda, 2014).

Kermack and McKendric (1927) are known in science for their significant contributions to epidemiology, since their work has led to an understanding of the dynamics of the diseases, developing a system of mathematical equations with a reach that is currently applied in different fields of research, including agriculture, where these mathematical bases help understand, compare and predict the spatial and temporary behavior of plant diseases (Torres *et al.*, 2010).

Authors such as Breilh (2007) refer to epidemiological studies related to the importance of agricultural activity in diverse ecosystems, as well as their negative impacts. Likewise, Monsalve (2013) refers to the fact that in agriculture it is highly important to know and control the spatial variability that appears in most of the phenomena observed, and therefore the search for new alternatives of spatial modelling becomes necessary. Due to this, methodologies derived from spatial statistics, mainly Geostatistics, have been

de la dinámica de las enfermedades, desarrollando un sistema de ecuaciones matemáticas cuyo alcance se aplica actualmente en diferentes campos de investigación, entre ellos, la agricultura, donde éstos fundamentos matemáticos permiten conocer, comparar y predecir el comportamiento espacial y temporal de las enfermedades en las plantas (Torres *et al.*, 2010).

Autores como Breilh (2007) hacen referencia a estudios epidemiológicos relacionados con la importancia de la actividad agrícola en los diversos ecosistemas así como sus impactos negativos. Por su parte, Monsalve (2013) hace referencia al hecho de que en la agricultura, es transcendental conocer y controlar la variabilidad espacial que se presenta en la mayoría de los fenómenos observados, por tanto, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de modelización espacial. Es así, que metodologías derivadas de la estadística espacial, propiamente la Geoestadística, han sido ampliamente utilizadas en el análisis de distribuciones de plagas y enfermedades agrícolas, así como su interacción con el ambiente y otras variables abióticas, considerando al espacio geográfico como “un conjunto de sitios ocupados por plantas enfermas, sanas, expuestas o removidas” en donde resulta necesario conocer la dinámica espacial que siguen (Riley *et al.*, 2016). Debido a la importancia del cultivo de aguacate y de la antracnosis para el Estado de México, el objetivo de este trabajo consistió en analizar su distribución espacial en cuatro municipios productores, utilizando herramientas derivadas de la estadística espacial, es decir, Geoestadística.

El estudio se llevó a cabo en Coatepec Harinas, Tenancingo, Donato Guerra y Temascaltepec, considerando 200 árboles de aguacate del cultivar Hass en cada municipio, mismos que fueron seleccionados de manera aleatoria y georreferenciados con un GPS diferencial marca Trimble. Los criterios que se consideraron para la selección de estos árboles incluyeron el rango de edad, el cual osciló entre los

widely used in the analysis of agricultural pest and disease distribution, as well as their interaction with the environment and other abiotic variables, considering the geographic space as “a set of locations covered by diseased, healthy, exposed or removed plants” where it is crucial to understand the spatial dynamics they follow (Riley *et al.*, 2016). Due to the importance of the avocado crop and anthracnosis for the State of Mexico, the aim of this work was to analyze their spatial distribution in four producing municipalities, using tools derived from spatial statistics, i.e., Geostatistics.

The study was carried out in Coatepec Harinas, Tenancingo, Donato Guerra and Temascaltepec, considering 200 avocado trees of the Hass cultivar in each municipality, all of which were selected at random and georeferenced using a Trimble brand GPS. One criterion followed for the selection of these trees included the age range, which fluctuated between 5 and 10 years. In addition, we verified that the agronomic management was carried out in a similar fashion in the four municipalities, observing that the owners of the trees only carried out culture controls occasionally.

Likewise, out of each georeferenced tree, 12 branches were considered, four in each of the strata of the trees (upper, middle and lower), and in turn, 12 fruits with symptoms of anthracnosis were considered (four for every stratum of the trees), in which the incidence was obtained by taking 0 to 12 diseased fruits per tree as a reference (Ávila *et al.*, 2004). It is worth mentioning that in sampled plots, avocado is planted only for local commerce, and its agricultural management is minimum, with a traditional control of pests and diseases, as mentioned above. Samples were taken fortnightly between July and December of the year 2018, for a total of 48 samplings (modified from Rivera *et al.*, 2018).

To identify the causal agent, samples were taken from infected fruits, then taken to the

cinco y 10 años, además se verificó que el manejo agronómico fuera llevado de manera similar en los cuatro municipios, observando que los dueños de los árboles sólo realizaron control cultural de manera ocasional.

Así mismo, de cada árbol georreferenciado se consideraron 12 ramas, cuatro en cada uno de los estratos de los árboles (alto, medio y bajo), y, a su vez, se seleccionaron 12 frutos con síntomas de antracnosis (cuatro por cada estrato del árbol), mismos donde la incidencia se obtuvo tomando como referencia de cero hasta 12 frutos enfermos por árbol (Ávila *et al.*, 2004)., cabe mencionar que en las parcelas muestreadas se cultiva aguacate únicamente para comercio local y cuyo manejo agronómico es mínimo, controlando las plagas y enfermedades de manera tradicional, como se mencionó anteriormente. Cada muestreo se llevó a cabo cada 14 días durante los meses de julio a diciembre del año 2018, teniendo un total de 48 muestreos (modificado de Rivera *et al.*, 2018).

Para la identificación del agente causal se tomaron muestras de frutos infectados, los cuales fueron llevados al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM para la identificación y observación de *Colletotrichum gloeosporioides*, mismos que fueron colocados en cámaras húmedas y puestos dentro de una incubadora a 24 °C, después de 7 días las muestras fueron revisadas y se realizaron siembras de tejido enfermo en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), de acuerdo a la metodología empleada por Morales y Ángel (2007), realizando una caracterización morfológica de cepas monoco nidiales, las cuales se sembraron nuevamente en PDA y fueron colocadas en una incubadora a 24 °C.

Las características consideradas para la identificación morfológica de las cepas fueron el color, la consistencia y el tipo de crecimiento del micelio;

Phytopathology Lab of the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas of the UAEM for the identification and observation of *Colletotrichum gloeosporioides*, which were placed in wet chambers and placed in an incubator at 24 °C. After 7 days, the samples were checked and diseased tissue was planted in a potato-dextrose-agar (PDA) medium, following the methodology by Morales and Ángel (2007), performing a morphological characterization of monoconidial strains, which were replanted in PDA and placed in an incubator at 24 °C.

The characteristics considered for the morphological identification of the strains were color, the consistency and the type of myceliar growth, direction and length of hyphae on the edge of the culture, color and shape of culture, and the presence of concentric rings. It is worth mentioning that this procedure was carried out only to corroborate that this was the fungal species reported in literature as the causal agent of anthracnosis for avocado in Mexico (Rojo-Báez *et al.*, 2017).

In the samplings performed, we were able to identify symptoms of anthracnosis in trees from all four municipalities, therefore it is convenient to infer that this disease has a wide distribution. The symptoms found in the trees ranged from small dark spots on the pericarp of the fruits to larger, maroon to dark brown lesions, in which small acervuli-conidia-forming structures could be noticed at plain sight. Additionally, larger necrotic lesions with irregular and sunken edges were noticed, coinciding largely with reports by Morales and Ángel (2007), and by Aquino *et al.* (2008), who mention the presence of black, sunken, irregularly-shaped lesions with salmon-colored spores (conidia) on the fruits.

On the other hand, it is worth pointing out that anthracnosis symptoms appeared in the first stages

dirección y longitud de las hifas del borde del cultivo; color y forma del cultivo; coloración del centro del cultivo y la presencia de anillos concéntricos; cabe mencionar que este procedimiento se llevó a cabo únicamente con la finalidad de corroborar que se trataba de la especie fúngica reportada en la literatura como el agente causal de la antracnosis para el aguacate en México (Rojo-Báez *et al.*, 2017).

En los muestreos realizados se logró identificar síntomas de antracnosis en árboles de los cuatro municipios, por lo cual es conveniente inferir que ésta enfermedad presenta una amplia distribución; los síntomas encontrados en los árboles variaron desde pequeñas manchas oscuras sobre el pericarpio de los frutos, pasando también por lesiones mayores de colores marrón o café oscuro, en donde se podían apreciar pequeños acérvulos a simple vista, siendo estas las estructuras formadoras de conidios, así mismo, se encontraron lesiones necróticas de mayor tamaño con bordes irregulares y hundidos, coincidiendo en gran parte con lo reportado Morales y Ángel (2007) y por Aquino *et al.* (2008) quienes mencionan la presencia de lesiones hundidas, negras de forma irregular, con masas de esporas salmonadas (conidios) en los frutos.

Por otro lado, cabe destacar que los síntomas de antracnosis se presentaron en las primeras etapas de desarrollo de los frutos, comprobando lo propuesto por Juárez *et al.* (2010), quienes afirman que la infección ocurre en etapas tempranas del crecimiento, sin embargo, las lesiones típicas de la enfermedad aparecen hasta que dichos frutos alcanzan la etapa de maduración.

Una vez integradas las bases de datos obtenidos en los muestreos de frutos de aguacate con antracnosis, se llevó a cabo el análisis geoestadístico, comenzando con la estimación de los semivariogramas experimentales a partir de la incidencia obtenida en los muestreos, utilizando el software Variowin 2.2 (Software para el análisis de datos espaciales en 2D. Primavara Verlag, New York;

of fruit development, confirming the proposal by Juárez *et al.* (2010), who states that the infections take place in the early growth stages, although the lesions typical of the disease appear when the fruits reach the stage of maturity.

After integrating the data bases obtained in the samplings of avocado fruits with anthracnosis, the geostatistical analysis was carried out, starting with the estimation of the experimental semivariograms from the incidence obtained in the samplings, using the software Variowin 2.2 (Software for the analysis of spatial data in 2D. Primavara Verlag, New York; U.S.A.) (Maldonado *et al.*, 2017). The experimental semivariograms were adjusted to theoretical models, which tend to be spherical, gaussian, exponential, with a pure nugget effect, logarithmical, monomic and with a hole effect, where the plateau, range and effect parameters and nugget effect are modified until validation statistics are obtained which are adequate and help mathematically approve the adjusted models, such as the Standard Error of the Mean (SEM), Mean Squared Error (MSE) and the Dimensionless Mean Squared Error (DMSE) (Ramírez, 2012; Acosta *et al.*, 2018).

The experimental value of the semivariogram was calculated using the following expression (Isaaks and Srivastava, 1989; Journel and Huijbregts, 1978):

$$\gamma^*(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} [z(x_i+h) - z(x_i)]^2$$

Where $\gamma^*(h)$ is the experimental value of the semivariogram for the distance interval h , $N(h)$ is the number of pairs of sample points separated by the distance interval h , $z(x_i)$ is the value of the variable of interest for the sample point x_i , and $z(x_i+h)$ is the value of the variable of interest in the sample point x_i+h .

This work included the production of 48 semivariograms, which show that anthracnosis in

EEUU) (Maldonado *et al.*, 2017). Los semivariogramas experimentales fueron ajustados a modelos teóricos, los cuales suelen ser esféricos, gaussianos, exponenciales, de efecto pepita puro, logarítmicos, monómicos y de efecto agujero, donde los parámetros de meseta, rango y efecto pepita se van modificando hasta obtener estadísticos de validación que sean adecuados y permitan aprobar matemáticamente los modelos ajustados, tales como la Media de los Errores de Estimación (MEE), Error Cuadrático Medio (ECM) y Error Cuadrático Medio Adimensional (ECMA) (Ramírez, 2012; Acosta *et al.*, 2018).

El valor experimental del semivariograma fue calculado con la siguiente expresión (Isaaks y Srivastava, 1989; Journel y Huijbregts, 1978):

$$\gamma^*(h) = 12N(h) \sum N(h)_i - 1[z(x_i+h)z(x_i)]^2$$

Donde: $\gamma^*(h)$ es el valor experimental del semivariograma para el intervalo de distancia h ; $N(h)$ es el número de pares de puntos muestrales separados por el intervalo de distancia h ; $z(x_i)$ es el valor de la variable de interés en el punto muestral x_i , y $z(x_i+h)$ es valor de la variable de interés en el punto muestra x_i+h .

En este trabajo se elaboraron 48 semivariogramas, los cuales, demuestran que la antracnosis en el cultivo de aguacate presentó una distribución espacial de tipo agregado, ajustándose a modelos de tipo gaussiano y exponencial en los cuatro municipios, aunque también se presentaron modelos esféricos en varias fechas de muestreo (Cuadro 1), interpretando de esta forma que la antracnosis presenta un crecimiento acelerado a través del tiempo, y que en algún momento, es posible que permanezca constante y con tendencia a incrementarse en toda la superficie de la zona de estudio. Quiñones *et al.* (2016) mencionan que los modelos gaussia-

the avocado crops presented a spatial distribution of an aggregate sort, adjusting to gaussian and exponential models in the four municipalities, although spherical models also appeared in several sampling dates (Table 1), therefore interpreting that anthracnosis presents accelerated growth in time; it is possible that it remains constant and with a tendency to increase throughout the surface of the area of study. Quiñones *et al.* (2016) mention that the gaussian models may help explain the variability and capacity of the diseases to spread, and hence this study explains that the spatial continuity of anthracnosis was explained with the radial extension it covered, i.e., that the appearance of the disease in a tree led to the infection of adjacent trees.

This aggregation of the disease became particularly evident in the months of August, September, October, November and December, when changes in rainfalls, temperature and humidity were variable. However, in the remaining samplings, the disease remained constant in the sampled areas, mainly in Coatepec Harinas. This helps infer the existence of favorable weather conditions (ideal temperature and humidity, physiographical differences that allow for the accumulation of rain or irrigation water, etc.). Likewise, Fisher *et al.* (2012), mention that the high incidences of diseases such as anthracnosis are widely related to the resistance of phytopathogens such as *C. gloeosporioides*.

Regarding the adjusted parameters that helped validate the models, it is appropriate to mention the importance of the range, since it lies in explaining the distance at which there is association between the data sampled. The nugget effect represents the origin of the semivariogram, while the plateau is the highest point in which the data intersect; the level of spatial dependence was obtained by dividing the nugget effect between the plateau, explaining

Cuadro 1. Parámetros del semivariograma de los muestreos de Antracnosis de julio a diciembre, 2018.
Table 1. Parameters of the semivariogram of the anthracnosis samples between July and December, 2018.

| Muestreo | Media | Varianza | Modelo | Pepita | Rango | Meseta | PEP/Meseta (%) | Nivel de dependencia espacial |
|------------------|-------|----------|-----------|--------|--------|--------|----------------|-------------------------------|
| Coatepec Harinas | | | | | | | | |
| JUL-01 | 6.02 | 14.47 | Esférico | 0 | 20 | 12.3 | 0 | ALTA |
| JUL-02 | 6.92 | 7.2 | Gaussiano | 0 | 19.194 | 6.716 | 0 | ALTA |
| AGO-01 | 9.67 | 2.07 | Expo. | 0 | 19.2 | 1.806 | 0 | ALTA |
| AGO-02 | 9.6 | 2.67 | Expo. | 0 | 28 | 2.052 | 0 | ALTA |
| SEP-01 | 6.21 | 12.27 | Gaussiano | 0 | 24 | 11.44 | 0 | ALTA |
| SEP-02 | 5.77 | 11.39 | Expo. | 0 | 20.8 | 9.96 | 0 | ALTA |
| OCT-01 | 6.26 | 12.72 | Expo. | 0 | 19.2 | 11.83 | 0 | ALTA |
| OCT-02 | 6.02 | 13.45 | Gaussiano | 0 | 17.6 | 11.34 | 0 | ALTA |
| NOV-01 | 6.15 | 12.6 | Gaussiano | 0 | 19.2 | 11.6 | 0 | ALTA |
| NOV-02 | 6.07 | 10.62 | Expo. | 0 | 17.6 | 9.02 | 0 | ALTA |
| DIC-01 | 6.11 | 11.73 | Expo. | 0 | 22.4 | 10.92 | 0 | ALTA |
| DIC-02 | 6.07 | 12.37 | Expo. | 0 | 19.2 | 11.57 | 0 | ALTA |
| Tenancingo | | | | | | | | |
| JUL-01 | 8.92 | 6.87 | Gaussiano | 0 | 22 | 2.553 | 0 | ALTA |
| JUL-02 | 6.19 | 12.68 | Gaussiano | 0 | 20 | 8.84 | 0 | ALTA |
| AGO-01 | 9.75 | 2.08 | Expo. | 0 | 19.2 | 1.8 | 0 | ALTA |
| AGO-02 | 6.065 | 11.15 | Expo. | 0 | 30 | 9 | 0 | ALTA |
| SEP-01 | 6.19 | 12.55 | Expo. | 0 | 28 | 10.4 | 0 | ALTA |
| SEP-02 | 6.04 | 12.48 | Gaussiano | 0 | 22 | 10.08 | 0 | ALTA |
| OCT-01 | 6.01 | 11.1 | Gaussiano | 0 | 22 | 10.08 | 0 | ALTA |
| OCT-02 | 5.89 | 12.14 | Esférico | 0 | 25.6 | 10.14 | 0 | ALTA |
| NOV-01 | 5.56 | 12.5 | Gaussiano | 0 | 17.6 | 10.92 | 0 | ALTA |
| NOV-02 | 6.4 | 13.24 | Expo. | 0 | 22.4 | 11.76 | 0 | ALTA |
| DIC-01 | 5.55 | 12.43 | Gaussiano | 0 | 19.2 | 11.44 | 0 | ALTA |
| DIC-02 | 6.1 | 11.86 | Expo. | 0 | 19.2 | 10.92 | 0 | ALTA |
| Donato Guerra | | | | | | | | |
| JUL-01 | 6.55 | 8.14 | Expo. | 0 | 27.2 | 6.63 | 0 | ALTA |
| JUL-02 | 7.65 | 7.18 | Gaussiano | 0 | 22.5 | 4.6 | 0 | ALTA |
| AGO-01 | 9.04 | 5.008 | Gaussiano | 0 | 17.6 | 4.26 | 0 | ALTA |
| AGO-02 | 6.05 | 12.46 | Esférico | 0 | 20.8 | 10.01 | 0 | ALTA |
| SEP-01 | 5.57 | 9.94 | Expo. | 0 | 22.8 | 8.3 | 0 | ALTA |
| SEP-02 | 5.94 | 11.96 | Expo. | 0 | 20.9 | 9.12 | 0 | ALTA |
| OCT-01 | 5.86 | 12.36 | Expo. | 0 | 28 | 11.32 | 0 | ALTA |
| OCT-02 | 5.89 | 11.55 | Gaussiano | 0 | 17.6 | 10.8 | 0 | ALTA |
| NOV-01 | 5.51 | 11.98 | Esférico | 0 | 20.8 | 10.56 | 0 | ALTA |
| NOV-02 | 6.02 | 11.39 | Expo. | 0 | 22 | 8.88 | 0 | ALTA |
| DIC-01 | 6.49 | 10.97 | Expo. | 0 | 19.2 | 10.27 | 0 | ALTA |
| DIC-02 | 5.85 | 13.51 | Esférico | 0 | 22.4 | 11.6 | 0 | ALTA |
| Temascaltepec | | | | | | | | |
| JUL-01 | 6.37 | 7.77 | Gaussiano | 0 | 20.8 | 7.33 | 0 | ALTA |
| JUL-02 | 5.94 | 12.61 | Gaussiano | 0 | 22.8 | 12.22 | 0 | ALTA |
| AGO-01 | 9.51 | 2.77 | Expo. | 0 | 26.6 | 2.24 | 0 | ALTA |
| AGO-02 | 5.98 | 12.22 | Esférico | 0 | 22.4 | 10.08 | 0 | ALTA |
| SEP-01 | 5.83 | 11.47 | Expo. | 0 | 20.8 | 10.92 | 0 | ALTA |
| SEP-02 | 6.11 | 12.52 | Gaussiano | 0 | 16 | 10.14 | 0 | ALTA |
| OCT-01 | 6.18 | 11.91 | Expo. | 0 | 19.2 | 9.84 | 0 | ALTA |
| OCT-02 | 5.85 | 13.7 | Gaussiano | 0 | 17.6 | 11.62 | 0 | ALTA |
| NOV-01 | 6.09 | 11.66 | Expo. | 0 | 27.2 | 10.44 | 0 | ALTA |
| NOV-02 | 5.89 | 10.33 | Gaussiano | 0 | 19.52 | 9.54 | 0 | ALTA |
| DIC-01 | 5.95 | 12.43 | Gaussiano | 0 | 20.8 | 10.34 | 0 | ALTA |
| DIC-02 | 6.09 | 11.04 | Gaussiano | 0 | 19.2 | 10.08 | 0 | ALTA |

01) Primer muestreo, 02) Segundo muestreo / 01) First sampling, 02) Second sampling.

nos permiten explicar la variabilidad y la capacidad de diseminación de las enfermedades, por lo que en este estudio, se explica que la continuidad espacial de antracnosis se explicó con la extensión radial que ocupó, es decir, que la aparición de la enfermedad en un árbol llevó a la infección de los árboles aledaños.

Esta agregación de la enfermedad se hizo más evidente sobre todo durante los meses de agosto, septiembre, noviembre y diciembre, cuando los cambios en la precipitación, temperatura y humedad fueron variables, sin embargo, en los muestreos restantes, la enfermedad permaneció constante en las zonas muestreadas, sobretodo en Coatepec Harinas; lo anterior, permite inferir la existencia de condiciones ambientales favorables (temperatura y humedad idóneas, diferencias fisiográficas que permiten la acumulación de agua de riego o de lluvia, etc.). Así mismo, Fisher *et al.* (2012), mencionan que las altas incidencias de las enfermedades como la antracnosis están estrechamente relacionadas a la capacidad de resistencia que poseen los fitopatógenos como *C. gloeosporioides*.

En cuanto a los parámetros ajustados que permitieron validar los modelos es conveniente mencionar la importancia del rango, ya que radica en explicar a qué distancia existe asociación entre los datos muestreados. El efecto pepita, representa el origen del semivariograma, mientras que la meseta es el punto máximo donde existe intersección entre los datos; el nivel de dependencia espacial se obtuvo al dividir el efecto pepita entre la meseta, expresando el resultado en porcentaje (Ramírez, 2012). Es así que los valores de alcance de la enfermedad para los muestreos exponenciales, esféricos y gaussianos presentaron valores desde 19.2 m hasta 28 m (Cuadro 1).

El efecto pepita para todos los modelos ajustados fue igual a cero (Cuadro 1), que de acuerdo con Twizeyimana *et al.* (2008), puede ser interpretado

the result as a percentage (Ramírez, 2012). In this way, the values of the reach of the disease for the exponential, spherical and gaussian samplings displayed values between 19.2 m and 28 m (Table 1).

The nugget effect for all the models adjusted was equal to zero (Table 1), which, according to Twizeyimana *et al.* (2008), can be interpreted as a high level of aggregation of the incidence of the disease. This study created maps through kriging, to estimate the percentages of the surface infected and the values related to non-sampled points. In this way, it was possible to view the spatial distribution of the disease for each municipality and sampling date. These maps were obtained using the software Surfer 9 (Surface Mapping System, Golden Software Inc. 809, 14th Street. Golden, Colorado 80401-1866. U.S.A.).

The 48 maps created clearly show points or centers of aggregation, which remained constant from beginning to end of the sampling period. This indicates that the disease is present in these areas, and is latent and constant, waiting for favorable conditions that help it proliferate. These infection patches in the map are assumed to be the main sources of infection from which the disease originates, and from where it is distributed to the entire sampled area (Figures 1 A, B, C, D). In regard to this, Cárdenas *et al.* (2017) mention that the semivariograms and the maps created with kriging help identify sources of infection of diseases. At the same time, they suggest that Geostatistics is a tool that helps explain the spatial arrangement followed by the diseases in plantations, thus contributing to accurate and timely decision-making processes, contributing to the creation of integrated management strategies.

The highest percentage of infected surface in the municipality of Coatepec Harinas was 100% in July, August, November and December, whereas in Donato Guerra, it was 100% only for the first

como un alto nivel de agregación de la incidencia de la enfermedad. En este estudio se generaron mapas a través del krigado, para estimar los porcentajes de superficie infectada y los valores asociados a puntos no muestreados, de esta manera fue posible visualizar la distribución espacial de la enfermedad para cada municipio y fecha de muestreo. Éstos mapas se obtuvieron con el software Surfer 9 (Surface Mapping System, Golden Software Inc. 809, 14th Street. Golden, Colorado 80401-1866. USA).

Los 48 mapas elaborados muestran claramente puntos o centros de agregación, mismos que se mantuvieron constantes desde el inicio y hasta el final del periodo de muestreo, esto denota que la enfermedad se presenta en esas zonas, y además se mantiene latente y constante, esperando que surjan condiciones favorables que le permitan proliferar. Se asume que esos parches de infección presentes en los mapas, son los principales focos de infección de donde surge la enfermedad y desde donde se distribuye a toda la zona muestreada (Figura 1 A, B, C, D). Con respecto a lo anterior, Cárdenas *et al.* (2017) mencionan que los semivariogramas y los mapas generados a través del krigado permiten identificar focos de infección de las enfermedades, y, a su vez, sugieren que la Geostatística es una herramienta que permite dar explicación al arreglo espacial que siguen las enfermedades en los cultivos, y de esta manera contribuir a la toma de decisiones precisas y oportunas, contribuyendo a la generación de estrategias de manejo integrado.

El porcentaje de superficie infectada más alto en el municipio de Coatepec Harinas fue de 100% en julio, agosto, noviembre y diciembre mientras que para Donato Guerra fue de 100% únicamente para el primer muestreo del mes de noviembre, sin embargo, para el segundo muestreo de ese mismo mes, el porcentaje de infección se redujo un 21% en ese municipio.

En el municipio de Temascaltepec, al igual que en los municipios anteriores, también se presenta-

sampling in November, although for the second sampling in the same month, the percentage of infection decreased by 21% in that municipality.

In the municipality of Temascaltepec, as in the municipalities mentioned above, percentages of 100% for the infection of the disease were also displayed. In July, October, November and December, the rest of the samplings, these percentages of infection also remained above 90%, with the exception of the last sampling, whose infection value was 86%. Likewise, in the municipality of Tenancingo, the percentages of infection by *C. gloeosporioides* remained between 87 and 100%, the latter percentage found in the second sampling of September and the first one in October.

Due to the above, in all the samplings performed in the four municipalities, the level of spatial dependence was high in all cases, suggesting that a correct sampling scale was used and the error was minimal (Table 1). This is also confirmed by the high spatial dependence displayed in all samplings, which proved the existing correlation between the data. Therefore, these results coincide with reports by Quiñones *et al.* (2016), who suggest that the high spatial dependence is an indicator of the relationship between the georeferenced data and the nature of the variable under study, considering the size, shape and configuration of the spatial units.

In conclusion, anthracnosis in avocado displayed an aggregate spatial behavior; we found clearly defined aggregation centers, which remained constant during the six months of sampling in all the areas of study. The spatial distribution was adjusted to gaussian, exponential and spherical models, which helped explain the spatial dependence of the anthracnosis found in the four municipalities. Geostatistics has proven to be one of the methodologies used in the agricultural sector which has been efficient for the analysis

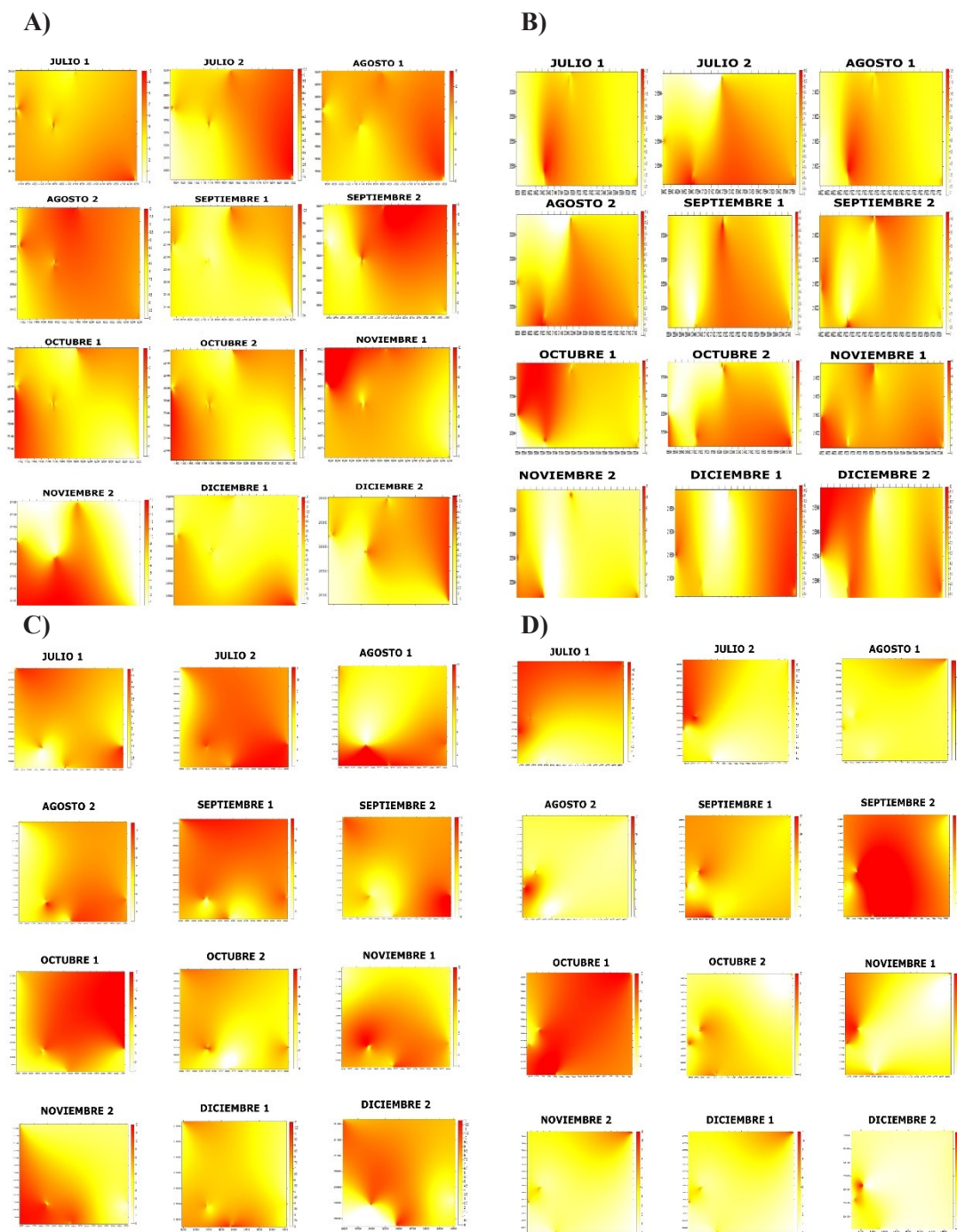


Figura 1. Mapas de incidencia de infección de antracnosis en frutos de aguacate en el Estado de México por municipio A) Coatepec Harinas, B) Donato Guerra, C) Temascaltepec y D) Tenancingo.

Figure 1. Anthracnose infection incidence maps in avocado fruits in the State of Mexico by municipality A) Coatepec Harinas, B) Donato Guerra, C) Temascaltepec and D) Tenancingo.

ron porcentajes de infección de la enfermedad del 100%, en julio, octubre, noviembre y diciembre, el resto de los muestreos, estos porcentajes de infección se mantuvieron por arriba del 90%, a excepción del último muestreo, cuyo valor de infección fue de 86%. Así mismo, en el municipio de Tenancingo, los porcentajes de infección por *C. gloeosporioides* se mantuvieron entre el 87 y el 100%, encontrando esta totalidad en el segundo muestreo de septiembre y el primero de octubre.

Por lo mencionado anteriormente, en todos los muestreos realizados para los cuatro municipios, el nivel de dependencia espacial fue alto en todos los casos, lo que sugiere que se utilizó una escala de muestreo correcta y el error fue mínimo (Cuadro 1). Esto también se corrobora debido a la alta dependencia espacial que se presentó en todos los muestreos, misma que demostró la correlación existente entre los datos. Por lo que estos resultados coinciden con lo reportado por Quiñones *et al.* (2016), quienes sugieren que la alta dependencia espacial es un indicador que refiere la relación entre los datos georreferenciados y a la naturaleza de la variable bajo estudio, considerando el tamaño, forma y configuración de las unidades espaciales.

En conclusión, la antracnosis en el aguacate presentó un comportamiento espacial agregado, encontrando centros de agregación claramente definidos, los cuales se mantuvieron constantes durante los seis meses de muestreo en todas las zonas de estudio. La distribución espacial se ajustó a modelos gaussianos, exponenciales y esféricos, permitiendo explicar la dependencia espacial que se presentó de la antracnosis en los cuatro municipios. La Geostatística ha demostrado ser una de las metodologías empleadas en el sector agrícola que ha sido eficaz en el análisis de las distribuciones espaciales de las enfermedades de los cultivos, facilitando a su vez, la adecuada, pertinente y oportuna toma de decisiones acerca del manejo integrado. Los resultados sugieren

of spatial distributions of crop diseases, helping, in turn, to make adequate, pertinent and timely decisions on the integrated management. The results suggest carrying out preventive applications in the initial infection points, since it would have an effect on the change of the spatial patterns of the disease. Likewise, we propose applying curative fungicides at the appearance of the symptoms and on focus points in order to avoid the disease spreading onto the rest of the crop. Finally, this type of investigations contribute widely to minimizing both investment costs and the environmental impact produced by the use of agrochemicals in the avocado producing areas of the State of Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Science and Technology Council for the scholarship granted for Graduate studies. To the avocado producers in the State of Mexico for the collaboration in taking samples. Dedicated to Alfredo Ruiz Orta.

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

realizar aplicaciones preventivas en los puntos iniciales de infección, porque tendría un efecto en el cambio de los patrones espaciales de la enfermedad, así mismo, se propone realizar aplicaciones con fungicidas curativos al inicio de los síntomas y de forma focalizada para evitar la diseminación de la enfermedad al resto del cultivo. Así mismo, este tipo de investigaciones contribuyen ampliamente a minimizar, por una parte, los costos de inversión, y por otro lado, también a disminuir de alguna manera el impacto ambiental que se produce por el uso de agroquímicos en las regiones productoras de aguacate en el Estado de México.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de Posgrado. A los productores de aguacate del Estado de México por la colaboración para realizar los muestreos. Dedicado para Alfredo Ruiz Orta.

## LITERATURA CITADA

- Acosta-Guadarrama, AD, Ramírez-Dávila JF, Rivera-Martínez R, Figueroa-Figueroa DK, Lara-Díaz AV, Maldonado-Zamora FI y Tapia-Rodríguez A. 2017. Distribución Espacial de Trips spp. (Thysanoptera) y Evaluación de su Control Mediante el Depredador *Amblyseius swirskii* en el Cultivo de Aguacate en México. *Southwestern Entomologist*, 42: 435-446. <https://doi.org/10.3958/059.042.0214>
- Aquino MJG Vázquez GLM y Reyes RBG. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. Con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:127-137. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v26n2/v26n2a5.pdf>
- Ávila-Quezada GD, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera G, Vaquera-Huerta H y Tijerina-Chávez L. 2003. Spatial and temporal dynamic of scab (*Sphaceloma perseae* Jenk.) on avocado (*Persea americana* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:152-160. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221209.pdf>
- Basulto SF, Díaz PR, Gutiérrez AO, Santamaría FJ y Larqué SA. 2011. Control de dos Especies de *Colletotrichum* causantes de Antracnosis en Frutos de Papaya Maradol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(5): 631-643 p. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S2007-09342011000500001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S2007-09342011000500001)
- Breilh J. 2007. Nuevo modelo de acumulación y agroindustria: las implicaciones ecológicas y epidemiológicas de la floricultura en Ecuador. *Ciência & Saúde Coletiva* 12(1):91-104. <http://www.scielo.br/pdf/csc/v12n1/09.pdf>
- Cárdenas PNJ, Darghan CAE, Sosa RMD y Rodríguez A. 2017. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 22: 209-220. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.61161>
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CH, Brownstein JS, Madoff L, McCraw L and Gurr S. 2012 Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 484:7393. <https://doi.org/10.1038/nature10947>.
- Isaaks E and Srivastava M. 1988. Spatial continuity measures for probabilistic and deterministic geostatistics. *Mathematical Geology*, 20(4): 313-341. <https://doi.org/10.1007/BF00892982>
- Journel A and Huijbregts CJ. 1978. Mining geostatistics. London, Reino Unido: Academic Press.
- Juárez BGP, Sosa MME y López MA. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 4:2. 14-23. [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)
- Kermack, W O y McKendrick AG. 1927. "Contributions to the Mathematical Theory of Epidemics". *Proceedings of the Royal Society of London*. 115:700-721. [www.jstor.org/stable/94815](http://www.jstor.org/stable/94815).
- Maeda CNS. 2014. Anthracnose of papaya in Hawai'i. Mānoa (US): College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawai'i.
- Maldonado FI, Ramírez JF, Lara AV, Acosta DA, Rivera R y Rodríguez TA. 2017. Mapeo de la distribución espacial de trips (Insecta: Thysanoptera) en parcelas comerciales de aguacate Var. Hass en Coatepec Harinas, Estado de México. *Ecosistemas* 26(2): 52-60. <https://doi.org/19.7818/ECOS.2017.26-2.06>
- Monsalve GN. 2013. Modelos jerárquicos bayesianos espaciales en epidemiología agrícola. *Universitat Politècnica de València*. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/19161>
- Morales GJL y Ángel PME. 2007. Hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Editorial Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 265 p.
- Orozco HME, García FB, Álvarez AG y Mireles LP. 2017. Tendencias del sector agrícola, Estado de México. *Quivera, Revista de Estudios Territoriales* 19(1): 99-121. <https://www.redalyc.org/pdf/401/40153531006.pdf>
- Quiñones VR, Sánchez PJR, Pedraza EAK, Castañeda VA y Franco MO. 2016. Distribución espacial de la roya transversal (*Uromyces transversalis*) del gladiolo durante el ciclo primavera-verano en la región sureste del estado de México. *Rev. FCA UNCUYO*. 48: 209-220. [http://revista.fca.uncu.edu.ar/images/stories/pdfs/201602/Cp15\\_Snchez\\_Pale.pdf](http://revista.fca.uncu.edu.ar/images/stories/pdfs/201602/Cp15_Snchez_Pale.pdf)
- Ramírez DJF. 2012. Geoestadística, principios básicos, aplicaciones y limitaciones. Primera edición. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 135 pp.
- Riley MB, Williamson, MR and Maloy O. 2016. Plant disease diagnosis.
- Rivera MR, Ramírez DJF y Acosta GAD. 2018. Distribución espacial de las poblaciones de huevos de *Bactericera cockerelli* Sulc. en el cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Acta universitaria*, 28(5): 24-33. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1944>
- Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2017. Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista mexicana de fitopatología* 35(3): 549-570. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>
- SENASICA. 2019. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (Consultado 11-oct-2018). <https://www.gob.mx/senasica>
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (Consultado 11-1-2018 en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>)
- Software para el análisis de datos espaciales en 2D. Primavera Verlag, New York; EEUU
- Surface Mapping System, Golden Software Inc. 809, 14th Street. Golden, Colorado 80401-1866. USA.

- Torres E, Tovar J y Ceballos LA. 2010. Tres procedimientos de análisis epidemiológico en palma de aceite e incorporación de atributos del paisaje. *Revista Palmas*, 31(especial): 403-415. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1545>
- Trinidad AE, Ascencio VF, Ulloa J, Ramírez, J, Ragazzo SJ, Calderón SM y Bautista RP. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19:3953-3964. <https://doi.org/10.29312/remex-ca.v0i19.664>
- Twizeyimana M, Ojiambo PS, Sonder k, Ikotun, T, Hartman GL and Bandyopadhyay R. 2008. Pathogenic variation of *Phakopsora pachyrhizi* infecting soybean in Nigeria. *Phytopathology* 99: 353-361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0353>.

# Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*

## Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagónicas a *Sclerotium cepivorum*

Martha Delia Ocegueda-Reyes, Josefina Casas-Solís\*, Gil Virgen-Calleros, Diego Raymundo González-Eguiarte, Eduardo López-Alcocer, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. CP.44600. Camino Ramón Padilla No. 2100. Nextipac, CP. 44600. Zapopan, Jalisco; Victor 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. 36820. Irapuato Guanajuato, México. \*Autor para correspondencia: jcasasmicro@gmail.com

Recibido: 04 de Noviembre, 2019.

Aceptado: 14 de Diciembre, 2019.

Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solís J, Virgen-Calleros G, González-Eguiarte DR, López-Alcocer E and Olalde-Portugal V. 2020. Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 146-159.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-2

Primera publicación DOI: 22 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 22, 2019.

**Resumen.** La pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* ocasiona grandes pérdidas económicas en el género *Allium* a nivel nacional. En este trabajo se aislaron, identificaron y caracterizaron tres rizobacterias con efecto antagonico sobre este hongo. Se aislaron 656 bacterias en muestras de suelo de la rizosfera de plantas de cebolla (*Allium cepa*). Y se evaluó el antagonismo *in vitro* a *S. cepivorum*. 23 de estos aislados mostraron actividad antagonica con halos de inhibición

**Abstract.** White rot caused by the fungus *Sclerotium cepivorum* causes great economic losses in the genus *Allium* nationwide. In this work, three rhizobacteria with antagonistic effect on this fungus were isolated, identified and characterized. 656 bacteria were isolated in soil samples from the rhizosphere of onion plants (*Allium cepa*). And *in vitro* antagonism to *S. cepivorum* was also evaluated. 23 of these isolates showed antagonistic activity with inhibition halos greater than 5 mm; three of these were greater than 20 mm; these were selected and identified as Gram positive bacilli, belonging to the genus *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*. These rhizobacteria showed enzymatic activity of 1-aminocyclopropane 1-carboxylate deaminase, production of indolacetic acid and siderophores, as well as NaCl tolerance (up to 7.5%). Temperatures of 24 and 37 °C and humidity (50, 75 and 100%) did not affect bacterial development. Of the cell-free extracts obtained in different growth phases, the highest antifungal activity on *S. cepivorum*

superiores a 5 mm; tres de estos fueron mayores a 20 mm, los cuales se seleccionaron, y se identificaron como bacilos Gram positivos, pertenecientes al género *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. Estas rizobacterias presentaron actividad enzimática de 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa, producción de ácido indolacético y sideróforos, tolerancia a NaCl (hasta 7.5%). Las temperaturas de 24 y 37 °C y humedad (50, 75 y 100%) no afectaron el desarrollo bacteriano. De los extractos libres de células obtenidos en diferentes fases de crecimiento, la mayor actividad antifúngica sobre *S. cepivorum* se obtuvo con los extractos de la fase estacionaria (16 a 24 h de incubación). Por los atributos de estas rizobacterias podrían ser consideradas como una alternativa para el control de *S. cepivorum* en cebolla.

**Palabras clave:** Pudrición blanca, *Bacillus*, sideróforos, ácido indolacético, ACC, sobrevivencia.

*Sclerotium cepivorum*, es un hongo que causa la enfermedad conocida como pudrición blanca en el género *Allium* (cebolla, ajo, puerro) (Castillo *et al.*, 2016). Esta enfermedad afecta a la planta, en cualquier etapa de desarrollo y su infección se incrementa a medida que crece el sistema radical y el bulbo, presenta esclerocios, que son estructuras de resistencia estimulados por compuestos de azufre presentes en los exudados radicales de la planta como aquil cisteína y sulfóxidos; que son persistentes y de fácil diseminación (Elshahawy *et al.*, 2017). En México la enfermedad se encontró por primera vez en Zacatecas en 1990 (Reveles-Hernández *et al.*, 2014). *Sclerotium cepivorum* ocasiona baja calidad y rendimiento y por ende grandes pérdidas económicas. Se han utilizado diversos productos químicos como tebuconazol, mancozeb y captan para erradicar a este patógeno (Hussain *et*

was obtained with the stationary phase extracts (16 to 24 h of incubation). Due to the attributes of these rhizobacteria they could be considered as an alternative for the control of *S. cepivorum* in onion.

**Keywords:** White rot, *Bacillus*, siderophores, indolacetic acid, ACC, survival.

*Sclerotium cepivorum* is a fungus that causes the disease known as white rot in the genus *Allium* (onion, garlic, leek) (Castillo *et al.*, 2016). This disease affects plants in any stage of development and its infection increases as the root system and the bulb grow; it presents sclerotia, which are structures of resistance, stimulated by sulfur compounds in the root exudates of the plant, such as aquil cysteine and sulfoxides, which are persistent and easily disseminated (Elshahawy *et al.*, 2017). In Mexico, the disease was found for the first time in Zacatecas in 1990 (Reveles-Hernández *et al.*, 2014). *Sclerotium cepivorum* causes low quality and yield, and therefore large economic losses. Several chemical products have been used to eradicate this pathogen, including tebuconazole, mancozeb and captan (Hussain *et al.*, 2017). However, due to epidemiological characteristics of the pathogen, after the sclerotia establish themselves in the soil, they can remain there for up to 40 years (Reveles-Hernández *et al.*, 2014). In addition, the inadequate use of fungicides has had a negative impact on the environment and its application is expansive their use is costly. As an alternative for the reduction of these products and to lessen the impact on the environment, native fungi and bacteria have been used to suppress white rot, thanks to their biocontrolling capacity (Vega-Celedón *et al.*, 2016; Kumbhar *et al.*, 2018) and biofertilizers with rhizobacteria (Moreno *et al.*, 2018).

*al.*, 2017). Sin embargo, por características epidemiológicas del patógeno, los esclerocios una vez establecidos en el suelo pueden permanecer hasta 40 años (Reveles-Hernández *et al.*, 2014), además, el inadecuado uso de los fungicidas ha ocasionado un impacto negativo sobre el medio ambiente y su aplicación resulta costosa. Una alternativa para reducir el uso de estos productos y aminorar el impacto ecológico, se han utilizado hongos y bacterias nativas para suprimir la pudrición blanca, por la capacidad biocontroladora (Vega-Celedón *et al.*, 2016; Kumbhar *et al.*, 2018) y de biofertilizantes con rizobacterias (Moreno *et al.*, 2018).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) que se encuentran en la rizosfera promueven el crecimiento y reducen la incidencia de las enfermedades (Glick, 2012; Hussain *et al.*, 2017). Dichas rizobacterias se clasifican de acuerdo a sus mecanismos de acción; unos actúan en el desarrollo de la planta para incrementar la disponibilidad de nutrientes por medio de la producción de ácido indolacético (AIA), actividad de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC desaminasa) que regulan los niveles de etileno, mediante la transformación de ACC en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio, fitohormonas sintetizadoras de auxinas, entre otros (Glick, 2012; Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Otros intervienen en la disminución del efecto nocivo de fitopatógenos a través de la producción de sustancias antagonicas (tetrasulfuros, tioles, tiofenos y dióxido de azufre) y sideróforos que secuestran el hierro presente en el medio y consecuentemente estará limitado para el patógeno (Glick, 2012), este parámetro ha tomado gran interés, debido al potencial que tienen para ser utilizados en el control biológico de fitopatógenos de hongos y bacterias (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Así mismo, las RPCV son tolerantes a condiciones de salinidad y evitan el estrés causado por factores bióticos y abióticos (Datta *et al.*, 2011;

The plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) found in the rhizosphere promote growth and reduce the incidence of diseases (Glick, 2012; Hussain *et al.*, 2017). These rhizobacteria are classified according to their mechanisms of action; some act on the development of the plant to increase the availability of nutrients with the production of indolacetic acid (IAA), the activity of the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase (ACC deaminase) that regulates the ethylene levels by transforming ACC into  $\alpha$ -ketobutyrate and ammonium, auxin-synthesizing phytohormones, among others (Glick, 2012; Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Others intervene in the reduction of the harmful effect of phytopathogens through the production of antagonistic substances (tetrasulfides, thiols, thiophenes and sulfur dioxide) and siderophores, that sequester the iron present in the medium, which will therefore be limited for the pathogen (Glick, 2012). This parameter has taken great interest, due to its potential use in the biological control of fungal and bacterial phytopathogens (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Likewise, PGPR's are tolerant to salinity conditions and they avoid the stress caused by biotic and abiotic factors (Datta *et al.*, 2011; Esquivel-Cote *et al.*, 2013). thus, the aim of the present study was to evaluate *in vitro* the potential of rhizobacteria against *Sclerotium cepivorum*, responsible for white rot in onion.

Six soil samples were collected from the rhizosphere of onion plants in the farm located in Santa Anita, municipality of Tlaquepaque, Jalisco, Mexico. In order to obtain rhizobacterial isolations, we took 10 g of soil adhered to the plant root, diluted them in 90 mL of sterile distilled water, then carried out serial dilutions ( $10^{-7}$ ) and inoculated 1 mL (three final dilutions) in Petri dishes with agar nutritive (AN), and incubate at 37 °C for 24 h. The PGPR strains were selected and



Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el potencial *in vitro* de rizobacterias contra *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla.

Se colectaron seis muestras de suelo de la rizosfera de plantas de cebolla del predio ubicado en Santa Anita, municipio de Tlaquepaque, Jalisco, México. Para obtener aislamientos de rizobacterias se tomaron 10 g de suelo adherido a las raíces de la planta, se diluyeron en 90 mL de agua destilada, se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-7}$ ) y se inoculó 1 mL (tres últimas diluciones) en cajas Petri con agar nutritivo (AN) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Las cepas de RPCV se seleccionaron y purificaron de acuerdo a su morfología típica de las colonias y se conservaron para evaluar su efecto antagónico. Asimismo, el aislamiento de *S. cepivorum*, se realizó de acuerdo con Vimard *et al.* (1986), a partir de esclerocios de cebollas afectadas por pudrición blanca, se inocularon en medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubaron a 20 °C. Se observó el desarrollo de micelio y esclerocios diariamente por 12 días (d) (Ortega-Aguilar *et al.*, 2011; Rivera-Méndez *et al.*, 2016).

Posteriormente se realizó el antagonismo de rizobacterias sobre *S. cepivorum*. El hongo se cultivó en ADS y se extrajo un disco de micelio de 5 mm de diámetro que se colocó en el centro de la caja Petri del mismo medio y se incubaron a 20 °C por 3 d. A continuación, se inocularon cuatro repeticiones en cada caja mediante una estría de la misma rizobacteria alrededor del disco micelial perteneciente al patógeno y se incubaron a 20 °C. El testigo fue la inoculación del hongo en ausencia de rizobacterias y el experimento se concluyó cuando el hongo testigo cubrió el total de la caja Petri (Sarti y Miyazaki, 2013). La prueba se realizó por duplicado; se midieron los halos de inhibición de las rizobacterias en *S. cepivorum*, adicionalmente se calculó el porcentaje de inhibición considerando el testigo como el crecimiento radial del hongo al 100 % .

purified according to their morphology, typical of cultures, and preserved to avoid their antagonistic effect. In turn, the isolation of *S. cepivorum* was carried out following Vimard *et al.* (1986), from onion sclerotia affected by white rot inoculated in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated at 20 °C. The development of mycelium and sclerotia was observed every day for 12 days (d) (Ortega-Aguilar *et al.*, 2011; Rivera-Méndez *et al.*, 2016).

The antagonism of rhizobacteria was carried out on *S. cepivorum*. The fungus was inoculated in SDA broth and a mycelium disc, 5 mm in diameter was extracted and placed in the center of the Petri dish with the same medium, and incubated at 20 °C for 3 d. Next, four repetitions were inoculated in each dish with a streak of the same rhizobacteria around the mycelial disc belonging to the pathogen and incubated at 20 °C. The control was the fungal inoculation in the absence of rhizobacteria; the experiment was concluded when the control fungus totally covered the Petri dish (Sarti and Miyazaki, 2013). The test was performed in duplicates; the inhibition zone of the rhizobacteria were measured in *S. cepivorum* and the percentage of inhibition was calculated considering the control as the radial growth of the fungus at 100% .

Moreover, the rhizobacteria with the greatest inhibition on fungus growth were characterized based on their plant growth promoting properties. This consisted of identification based on the colonial and tintorial morphology, and the metabolism by using the VITEX 2 system card (bioMérieux<sup>MR</sup>), following manufacturer specifications. The functions of PGPR were characterized by evaluating the presence of the activity of the ACC deaminase, siderophores, tolerance to NaCl and the production of IAA. The enzyme activity was determined by inoculating the bacteria in a minimum salt medium (MM) supplemented with 0.3 g L<sup>-1</sup> of ACC, and incubating at 37 °C for 24 h (Luna *et al.*, 2013). In an AN we also determined the tolerance to

Por otro lado, de las rizobacterias que presentaron mayor inhibición sobre el hongo, se procedió a caracterizarlas en función de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Lo cual consistió en la identificación mediante la morfología colonial, tintorial y metabolismo (con la tarjeta del sistema VITEX 2 (bioMérieux<sup>MR</sup>), siguiendo las especificaciones del proveedor). Se caracterizaron las funciones de RPCV, con la evaluación de la presencia de la actividad del ACC desaminasa, sideróforos, tolerancia a NaCl y producción de AIA. La actividad enzimática se determinó inoculando las bacterias en un medio mínimo de sales (MM), suplementado con 0.3 g L<sup>-1</sup> de ACC, se incubaron a 37 °C por 24 h (Luna *et al.*, 2013), en AN se determinó la tolerancia a salinidad a diferentes concentraciones de NaCl (1.5 hasta 12%). La actividad ACC desaminasa, y tolerancia a NaCl (Sánchez *et al.*, 2016), se registró como positiva en aquellas bacterias que crecieron en estos medios.

Para determinar la producción de AIA se realizó mediante una reacción colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995). Las pruebas se realizaron por triplicado de cada uno de los aislados seleccionados; los datos se correlacionaron con una curva estándar de AIA (de 0 a 30 ppm) y se cuantificó la concentración de AIA de las muestras. Para la producción de sideróforos por las RPCV se determinó utilizando el medio cromo azurol S (CAS) de acuerdo a la metodología de Schwyn y Neilands (Louden *et al.*, 2011). Así mismo, se procedió a realizar la prueba de sensibilidad a antibióticos, por medio del método de Kirby Bauer (Bernal y Gúzman, 1984). Se prepararon suspensiones bacterianas a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> y se inocularon en cajas Petri con agar Mueller Hinton; posteriormente se colocó un multidisco<sup>®</sup> (Bio-Rad) con doce antimicrobianos y se incubaron a 37 °C por 24 h. Se registró el diámetro de la zona de inhibición y se determinaron

salinity at different concentrations of NaCl (1.5 to 12%). The ACC desaminase activity and tolerance to NaCl (Sánchez *et al.*, 2016) were recorded as positive in the bacteria that grew in this medium.

IAA production was determined with a colorimetric reaction using Salkowski's reactive (Glickmann and Dessaux, 1995). The tests were carried out in triplicate on each of the selected isolates; the data were correlated with a standard IAA curve (0 to 30 ppm) and the concentration of IAA of the samples was quantified. The production of siderophores by the PGPR was determined using the chrome azurol S (CAS) medium, according to Schwyn and Neilands (Louden *et al.*, 2011). Likewise, the survey of sensitivity to antibiotics was carried out using the method by Kirby Bauer (Bernal and Gúzman, 1984). Bacterial suspensions were prepared at a concentration of  $1.5 \times 10^7$  colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> and inoculated in Petri dishes with Mueller Hinton agar. Next, a multidisc<sup>®</sup> (Bio-Rad) was placed with twelve antimicrobials and incubated at 37 °C for 24 h. The diameter of the inhibition area was measured and the resistance and sensitivity profiles to the antibiotics were determined.

Furthermore, the bacterial kinetics was carried out for each selected isolate under axenic conditions: 1 mL of pre-inoculum of the bacteria was inoculated at a concentration of  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> in 50 mL of potato infusion, considered as the starting time (time 0). They were then incubated at 30 °C for a period of 32 h, during which, every 2 h, the absorbance was determined at 595 nm in a spectrophotometer (Jenway model 7305). Two aliquots were taken in each sampling time, one was used to determine the bacterial growth rate (CFU), placing 1 mL of the inoculant in AN dishes, which were incubated at 30 °C and the CFU were quantified every 4 h; the other aliquot was used to obtain Cell Free Extracts (CFE). To obtain the

los perfiles de resistencia y sensibilidad a los mismos.

Por otro lado, se realizó la cinética bacteriana de cada aislado seleccionado en condiciones axénicas, para este propósito se inoculó 1 mL de pre-inóculo de la bacteria a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  en 50 mL de infusión de papa considerado como tiempo inicial (tiempo 0). Posteriormente se incubaron a 30 °C por un periodo de 32 h, durante este tiempo cada 2 h se determinó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (modelo 7305 Jenway). Adicionalmente, en cada tiempo se tomaron dos alícuotas; una se utilizó para determinar la tasa de crecimiento bacteriano (UFC), colocando 1 mL del inóculo en cajas AN, se incubaron a 30 °C y se cuantificaron UFC cada 4 h, la otra alícuota se usó para la obtención de Extractos Libres de Células (ELC). Para la obtención de los ELC se centrifugaron a 11,000 rpm por 10 min se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ . El efecto antagonico de los extractos se evaluó por el método de excavación en cajas Petri con medio ADS de acuerdo con Mitidieri (1998) mencionado por Ariza y Sánchez (2012). Esta prueba se realizó por triplicado de cada uno de los aislados en un tiempo específico obtenido y un testigo (pozos con PDA en ausencia de ELC). Por último, se determinó la sobrevivencia de las rizobacterias a diferentes porcentajes de humedad y temperaturas. Se formaron tres tratamientos con diferentes porcentajes de humedad (50, 75 y 100%) en 10 g de suelo previamente esterilizado por autoclave por triplicado, cada tratamiento se inoculó con las cepas *Bacillus* y se sometieron por separado a dos temperaturas, a 24 y 37 °C para ver el efecto de sobrevivencia de las rizobacterias a las dos temperaturas y se incubaron por 15 d (Arribalzaga, 2007).

Se aislaron 656 rizobacterias y el hongo *Sclerotium cepivorum* de plantas de cebolla. El hongo se aisló e identificó mediante sus caracteres

CFE the samples were centrifuged at 11,000 rpm for 10 min and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane. The antagonistic effect of the extracts were evaluated using the method of excavation in Petri dished with a SDA medium, according to Mitidieri (1998) as mentioned by Ariza and Sánchez (2012). This test was performed in triplicates in each one of the isolations in a specific obtained time and a control (only with PDA in the absence of CFE). Finally, we determined the survival of the rhizobacteria at different percentages of humidity and at different temperatures. Three treatments were formed with different percentages of humidity (50, 75 and 100%) in 10 g of soil, previously sterilized (autoclaved) and in triplicate; each treatment was inoculated using the *Bacillus* strains and placed at two different temperatures, 24 and 37 °C, to observe the survival of rhizobacteria to both temperatures and then incubated for 15 d (Arribalzaga, 2007).

The fungus *Sclerotium cepivorum* and 656 rhizobacteria were isolated from onion plants. The fungus was isolated and identified by its morphological traits described in the taxonomic codes of Sarmiento and Velandía (2013). Out of the isolated bacterial diversity, only 23 isolations presented antagonistic activity and only three of these were larger than 20 mm and the percentages of inhibition of the rhizobacteria against *S. cepivorum* were between 21 and 24% (Table 1). The three selected isolates were confirmed as spore-forming bacilli using the VITEX 2 system with the reactive card. The biochemical tests were confirmed to be two *Bacillus subtilis* strains (1 and 2), and the third one was confirmed to be *B. amyloliquefaciens*, with a reliability of 95%. These characteristics have been reported by other authors for the genus *Bacillus* (Calvo and Zuniga, 2010).

The antagonistic effect of the *Bacillus* isolations on *S. cepivorum* may be due to the

morfológicos descritos en las claves taxonómicas de Sarmiento y Velandía (2013). De la diversidad bacteriana aislada, solo 23 aislados mostraron actividad antagónica y solo tres de estos fueron mayores a 20 mm y los porcentajes de inhibición de las rizobacterias contra *S. cepivorum* fueron entre 21 y 24% (Cuadro 1). De los tres aislados seleccionados, se confirmaron como bacilos positivos formadores de esporas, mediante el sistema VITEX 2 con la tarjeta reactiva, las pruebas bioquímicas confirmaron ser dos cepas *Bacillus subtilis* (1 y 2) y la tercera como *B. amyloliquefaciens*, con una confiabilidad del 95%. Estas características han sido reportadas por otros autores para el género *Bacillus* (Calvo y Zuniga, 2010).

El efecto antagónico de los aislados de *Bacillus* sobre *S. cepivorum*, puede deberse a la posible producción de moléculas antimicrobianas como lipopéptidos que han sido reportadas en rizobacterias (Sarti y Miyazaki, 2013; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). El Comité de Acción de Fungicidas Resistentes (FRAC por sus siglas en inglés), en el año 2018 enlistó a *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* como productoras de sustancias antifúngicas clasificadas en el grupo F, estas actúan en el transporte o síntesis de lípidos afectando la función e

possible production of antimicrobial molecules such as lipopeptides that have been reported in rhizobacteria (Sarti and Miyazaki, 2013; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). In 2018, the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), listed *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* as producers of antifungal substances classified in group F. They act in the transportation or synthesis of lipids, affecting the function and integrity of the cell membranes of pathogens (FRAC, 2018). On the other hand, Sánchez *et al.* (2016) reported that they are capable of producing iturines and phengicin that cause osmotic imbalances in spores and antifungal activity against filamentous fungi, along with surfactin, which inhibit the spore germination, excretion of antimicrobial enzymes such as  $\beta$ -glucosidases and proteases of fungi that cause leaf and root diseases (Da Silva *et al.*, 2018). Some authors have proven the biocontrolling potential of *B. subtilis* in the control of the genus *Fusarium* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* (Paredes-Escalante *et al.*, 2009), and other. In the case of *B. amyloliquefaciens*, it has antimicrobial capacity and it induces a defensive response in plants (Soto *et al.*, 2018).

**Cuadro 1. Propiedades bioquímicas y fisiológicas bacterianas relacionadas con la promoción de crecimiento de RPCV de tres aislados de cebolla.**

**Table 1. Biochemical and physiological bacterial properties related with the growth promotion of PGPR of three onion isolates.**

| Características                                                 | <i>B. subtilis</i> -1   | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>B. subtilis</i> -2   |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Antagonismo (Halos de inhibición en mm) <sup>x</sup>            | 21 ± 0.5 <sup>b</sup>   | 23 ± 0.2 <sup>a</sup>       | 20 ± 0.6 <sup>b</sup>   |
| Porcentaje de inhibición a <i>S. cepivorum</i> (%) <sup>x</sup> | 22.2 ± 0.5 <sup>b</sup> | 24.2 ± 0.2 <sup>a</sup>     | 21.3 ± 0.6 <sup>b</sup> |
| Actividad de ACC desaminasa <sup>y</sup>                        | Positiva                | Positiva                    | Positiva                |
| Tolerancia a NaCl (1.5 a 7.5%) <sup>y</sup>                     | Positiva                | Positiva                    | Positiva                |
| Producción de Sideróforos (mm) <sup>z</sup>                     | 18 ± 0.2 <sup>a</sup>   | 15 ± 0.1 <sup>b</sup>       | 10 ± 0.1 <sup>c</sup>   |

<sup>x</sup> Valores de antagonismos en promedio de ocho repeticiones ± desviación estándar, <sup>y</sup> Positiva = actividad o crecimiento, <sup>z</sup> Valores de producción de sideróforos en promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes dentro de cada hilera representan diferencia estadística (ANDEVA de una vía,  $p \leq 0.05$ ) / <sup>x</sup> Values of antagonisms in an average of eight repetitions ± standard deviation, <sup>y</sup> Positive = activity or growth, <sup>z</sup> Values of production of siderophores in an average of three repetitions ± standard deviation. Different letters in each row represent statistical differences (one way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

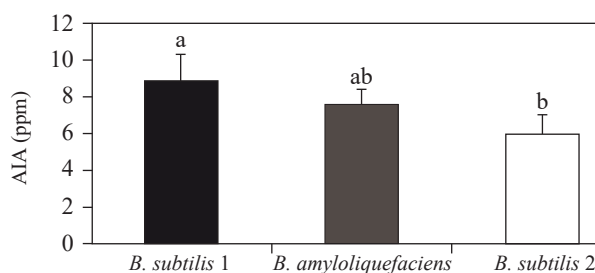
integridad de la membrana celular de los patógenos (FRAC, 2018). Por otra parte, Sánchez *et al.* (2016), reportaron que son capaces de producir iturinas y fengicinas que causan desequilibrios osmótico en las esporas y actividad antifúngica contra hongos filamentosos, además de surfactina que inhiben la germinación de las esporas, excreción de enzimas antimicrobianas como  $\beta$ -glucosidasas y proteasas de hongos causantes de enfermedades foliares y de raíces (Da Silva *et al.*, 2018). Algunos autores han demostrado el potencial biocontrolador de *B. subtilis*, en el control del géneros *Fusarium* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* (Paredes-Escalante *et al.*, 2009), entre otros. En el caso de *B. amyloliquefaciens* tiene capacidad antimicrobiana e induce a una respuesta de defensa en plantas (Soto *et al.*, 2018).

Los tres aislados presentaron actividad de ACC desaminasa que favorece el crecimiento de las plantas por su capacidad de convertir ACC en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio (Glick, 2014), además de actuar contra patógenos (Latif *et al.*, 2016) y tolerar niveles de estrés bióticos y abióticos (Vurukonda *et al.*, 2016), tolerando concentraciones de NaCl hasta de 7.5% (1280 mM) (Cuadro 1). Esto indica su adaptación al estrés causado por salinidad (Mahmood *et al.*, 2014), además que estas cepas de *Bacillus* favorece la eficiencia del uso del agua (Esquivel-Cote *et al.*, 2013) ya que pueden influir en la reducción de estrés y regulación la biosíntesis del etileno (Glick, 2014) mediante la escisión enzimática del ACC (Jayakumar *et al.*, 2018).

Para el caso de la producción de AIA, el *Bacillus subtilis*-1 fue significativamente mayor (Figura 1). Luna *et al.*, 2013 reportaron producción de indoles entre 2.3 a 6.8 mg L<sup>-1</sup> en cuatro cepas de *Bacillus*, esta variación depende del tipo de hospedante y Kumar *et al.* (2015) mencionan que el género *Bacillus* spp. es productor de AIA

The three isolations presented ACC deaminase activity that favors plant growth due to its ability to transform ACC into  $\alpha$ -ketobutirate and ammonium (Glick, 2014), as well as to act against pathogens (Latif *et al.*, 2016) and tolerate levels of biotic and abiotic stress (Vurukonda *et al.*, 2016), tolerating concentrations of NaCl of up to 7.5% (1280 mM) (Table 1). This indicates its adaptation to stress caused by salinity (Mahmood *et al.*, 2014); in addition, these *Bacillus* strains favor water use efficiency (Esquivel-Cote *et al.*, 2013), since they can exert an influence on stress reduction and on the regulation of ethylene biosynthesis (Glick, 2014) with the enzymatic division of the ACC (Jayakumar *et al.*, 2018).

For IAA production, *Bacillus subtilis*-1 was significantly higher (Figure 1). Luna *et al.*, 2013 reported a production of indoles between 2.3 and 6.8 mg L<sup>-1</sup> in four strains of *Bacillus*. This variation depends on the type of host and Kumar *et al.* (2015) mention that the genus *Bacillus* spp. is a producer of IAA and siderophores. The three *Bacillus* isolates produced siderophores (Table 1),



**Figura 1. Producción de AIA (ppm) con adición de triptófano por parte de aislados de *Bacillus*. Valores en promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes representan diferencia estadística (ANDEVA de una vía  $p \leq 0.05$ ).**

**Figure 1. Production of IAA (ppm) with the addition of tryptophan by *Bacillus* isolates. Values in the average of three repetitions  $\pm$  standard deviation. Different letters represent statistical differences (one way ANOVA  $p \leq 0.05$ ).**

y sideróforos. Los tres aislados de *Bacillus* produjeron sideróforos (Cuadro 1), la producción de estos, se ha documentado ampliamente en *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Estos metabolitos forman un complejo de hierro donde receptores proteicos reconocen específicamente a cada especie bacteriana; esto disminuye la disponibilidad del mineral en el suelo y se establecen una competencia por el hierro lo que es letal para bacterias patógenas (Glick, 2012), esto se asocia a un mecanismo de defensa de la planta contra fitopatógenos (Ahemad y Kibret, 2013), como fue demostrado en las cepas evaluadas contra *S. cepivorum* en el estudio. Los sideróforos antimicrobianos se sintetizan por lipopéptidos de los grupos de surfactina, fengicina e iturina, a través de la enzima péptido sintetasa no ribosomal. La unión de estos lipopéptidos a la membrana provoca despolarización, translocación y ataque a los componentes intracelulares; induciendo resistencia contra el patógeno (Jayakumar *et al.*, 2018). Estas rizobacterias, aumentan el hierro disponible en el hábitat natural (Tejera-Hernández *et al.*, 2011) y permite la absorción de este mineral por la planta para constituir un mecanismo de promoción de crecimiento (Gouda *et al.*, 2018).

Con respecto a la prueba de sensibilidad, los tres aislados del género *Bacillus* mostraron un perfil de sensibilidad a 30 µg de los antibióticos de cefalotina, amikacina, clorafenicol, ceftriaxona, y resistentes a penicilina (10 U). Esta prueba de sensibilidad representa la actividad metabólica de cada una de las bacterias afectada por diferentes factores, que influyen en la promoción de crecimiento y actividad antifúngica. Esta capacidad de transferir el material genético de la bacteria, propicia mecanismos adicionales de resistencia natural contra ciertas enfermedades (Gutiérrez *et al.*, 2017); actualmente se aplican antibioticos en la producción de cultivos que pueden repercutir negativamente en

and this production has been widely documented in *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). These metabolites form an iron complex in which protein receptors specifically recognize each bacterial species; this reduces the availability of the mineral in the soil and a competition takes place for iron, which is lethal for pathogenic bacteria (Glick, 2012), which relates to a defense mechanism in the plants against phytopathogens (Ahemad and Kibret, 2013), as shown in strains evaluated against *S. cepivorum* in the study. The antimicrobial siderophores are synthesized by lipopeptide of the groups of surfactin, phengicin and iturine, through the non-ribosomal synthetase peptide enzyme. The attachment of these lipopeptide to the membrane causes depolarization, translocation and attacks on the intracellular components, inducing resistance against the pathogen (Jayakumar *et al.*, 2018). These rhizobacteria increase the iron available in the natural habitat (Tejera-Hernández *et al.*, 2011) and helps the plant absorb this mineral to constitute a growth-enhancing mechanism (Gouda *et al.*, 2018).

Regarding the sensitivity test, the three isolations of the genus *Bacillus* displayed a sensitivity profile to 30 µg of the antibiotics cephalothin, amikacin, chloramphenicol, ceftriaxone, and resistant to penicillin (10 U). This sensitivity test represents the metabolic activity of each of the bacteria affected by different factors that exert an influence on the promotion of growth and antifungal activity. This ability to transfer the genetic material of the bacterium leads to additional natural resistance mechanisms against certain diseases (Gutiérrez *et al.*, 2017). Antibiotics are currently being applied to the production of crops that may have a negative repercussion on bacterial growth, formation of biofilm, production of indoles and the survival of bacteria in plants (Klein *et al.*, 2017).

el crecimiento de las bacterias, formación de biopeículas, producción de índoles y la supervivencia de las bacterias en la planta (Klein *et al.*, 2017).

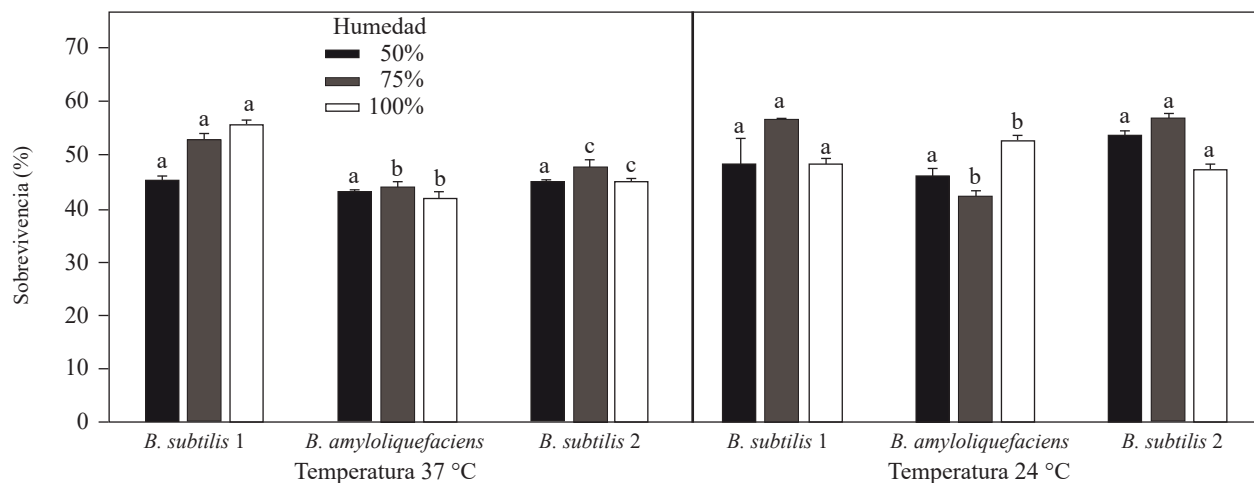
En el caso de la cinética bacteriana de cada aislado evaluado mostraron comportamientos similares en su desarrollo bacteriano; una fase de latencia constante hasta las 4 h, incrementó su desarrollo logarítmico hasta las 15 h; finalmente, la fase estacionaria se presentó hasta las 24 h; este comportamiento depende de la cepa bacteriana. Los metabolitos generados en la fase estacionaria mostraron un efecto inhibitorio contra el hongo, el ELC de tiempo 16 horas generó una inhibición del 25% y los extractos de 20 y 24 horas mostraron mayor efecto hasta el 35%. Esto puede estar relacionado a lo reportado en el género *Bacillus*, que como parte de su metabolismo libera productos tóxicos y forma metabolitos activos fúngicos como gramidicina, que fueron efectivos *in vitro* en el control de 23 diferentes fitopatógenos (Rodríguez *et al.*, 2017). Algunos autores han demostrado que los ELC de *Bacillus* presentaron antagonismo sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Da Silva *et al.*, 2018) y *Fusarium oxysporum* (Rodríguez *et al.*, 2017). Tanto los aislados y sus ELC de las rizobacterias en estudio, están relacionados con su efecto antagónico, de acuerdo a las características metabólicas evaluadas y con sus metabolitos producidos activos contra el hongo en estudio.

Finalmente, en el caso del estudio de la sobrevivencia de las rizobacterias a diferentes condiciones, mostraron que la temperatura de 24 °C con una humedad del 50%, *B. subtilis* presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia con 57.5% y el menor *B. amyloliquefaciens* con el 42.9% (Figura 2). Las tres rizobacterias mostraron que en la mayoría de las condiciones evaluadas no existen diferencias significativas en los índices de sobrevivencia con respecto a temperatura y humedad.

In the case of bacterial kinetics, each evaluated isolation displayed similar behaviors in their bacterial development; a phase of constant latency up to 4 h increased its logarithmic development until after 15 h, and finally, the stationary phase continued until after 24 h; this behavior depends on the bacterial strain. The metabolites generated in the stationary phase displayed an inhibiting effect on the fungus, the ELC of a time of 16 hours generated an inhibition of 25% and the 20 and 24 hour extracts displayed a greater effect of up to 35%. This may be related to reports on the genus *Bacillus*, which, as a part of its metabolism, released toxic products and forms fungal active metabolites such as gramidicin, which were effective *in vitro* in the control of 23 different phytopathogens (Rodríguez *et al.*, 2017). Some authors have shown that the ELC of *Bacillus* presented antagonism on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Da Silva *et al.*, 2018) and *Fusarium oxysporum* (Rodríguez *et al.*, 2017). Both the isolates and the CFE of the rhizobacteria in the study are related to their antagonistic effect, depending on the metabolic characteristics evaluated and the active metabolites produced against the fungus studied.

Finally, in the case of the study of the survival of the rhizobacteria under different conditions, they proved that in a temperature of 24 °C with a humidity of 50%, *B. subtilis* presented the highest percentage of survival with 57.5% and the lowest *B. amyloliquefaciens* with 42.9% (Figure 2). The three rhizobacteria showed that in most of the conditions evaluated, there are no significant differences in the survival rates with regard to temperature and humidity.

These result suggest a good adaptation of these rhizobacteria to the conditions of growth temperature *in vitro* of the fungus. Some authors mention that there is a great diversity of bacteria able to survive in different environments. Temperature



**Figura 2. Sobrevivencia de rizobacterias a diferentes porcentajes de humedad (50, 75 y 100 %) y temperaturas de 24 y 37 °C. Valores en promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma condición de temperatura y humedad representan diferencia estadística (Kruskal-Wallis  $p \leq 0.05$ ).**  
**Figure 2. Survival of rhizobacteria to different percentages of humidity (50, 75 and 100 %) and temperatures of 24 and 37 °C. Values in the averages of three repetitions ± standard deviation. Different letters in the same conditions of temperature and humidity represent statistical differences (Kruskal-Wallis  $p \leq 0.05$ ).**

Estos resultados sugieren una buena adaptación de estas rizobacterias a las condiciones de temperatura de cultivo *in vitro* del hongo. Algunos autores mencionan que existe una gran diversidad de bacterias capaces de vivir en diversos ambientes. La temperatura puede afectar a la célula en la estructura, procesos vitales de los microorganismos, velocidad de crecimiento, composición química y la actividad enzimática (Calvo y Zúñiga, 2010); sin embargo, en las condiciones evaluadas en la presente investigación se observó un comportamiento similar en el género *Bacillus*, esto se relaciona a las características proporcionadas por las endoesporas, estructuras de resistencia, que sobreviven a ciertas condiciones de humedad y temperatura, además promueven factores de transcripción involucrados en el proceso de esporulación, lo que favoreció el proceso de adaptación y la capacidad de antagonismo microbiano (Gouda *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2018).

may affect the cell in terms of structure, vital processes of microorganisms, growth rate, chemical composition and enzymatic activity (Calvo and Zúñiga, 2010). However, under the conditions evaluated in this investigation, a similar behavior was observed in the genus *Bacillus*, and this is related to the characteristics provided by the endospores, resistance structures that survive certain conditions of humidity and temperature, and also promote transcription factors involved in the sporulation process, which favors the process of adaptation and the ability of microbial antagonism (Gouda *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2018).

In conclusion, the rhizobacteria of the genus *Bacillus* presented in this study and the compounds generated in the stationary phase displayed *in vitro* antifungal activity against *S. cepivorum*, along with the functional and metabolic characteristics of PGPR such as ACC activity, tolerance to NaCl (up to 7.5%), bacterial kinetics and survival. They show biologically active strains that have an effect



En conclusión las rizobacterias del genero *Bacillus* de este estudio y los compuestos generados en la fase estacionaria demostraron *in vitro* actividad antifúngica contra *S. cepivorum*, además de las características funcionales y metabólicas de RPCV como actividad ACC, tolerancia a NaCl (hasta 7.5%), cinética bacteriana y sobrevivencia. Muestran cepas biológicamente activas que tienen efecto en el control de patógenos y capacidad de producir sustancias promotoras de desarrollo vegetal. De acuerdo con lo anterior, son una alternativa sustentable para reducir el impacto por los efectos negativos al uso de agroquímicos, evitando altos costos de producción, la degradación de los suelos y la contaminación del ambiente. Así mismo, biofertilizantes en el control de *S. cepivorum* en cultivos de cebolla.

## LITERATURA CITADA

- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E y Preciado-Ortiz RE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 35 (1):9-2. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61023295002>
- Ahemad M and Kibret M. 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26:1-20. Doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Ariza Y y Sánchez L. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova* 10(18): 1794-2470. [www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a01.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a01.pdf)
- Arribalzaga EB. 2007. Interpretación de las curvas de supervivencia. *Revista Chilena de Cirugía* 59(1):75-83. Doi:10.4067/S0718-40262007000100013
- Calvo P y Zuñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9(1): 31-39. [www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-22162010000100004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100004)
- Castillo H, Rojas RR y Villalta M. 2016. Actividad antagonista de *Gliocladium* sp. contra *Sclerotium cepivorum*. *Tecnología en Marcha* 57-54. Doi:10.18845 / tm.v29i7.2706
- Bernal RM y Guzman UM. 1984. Antibriograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby Bauer. *Biomedica* 4(3-4). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- on the pathogens control and the ability to promote plant growth-promoting substances. According to the above, they are a sustainable alternative for the reduction of the impact caused by negative effects to the use of agrochemicals, avoiding high production costs, soil degradation and environmental pollution, along with biofertilizers in the control of *S. cepivorum* in onion plantations.

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

- Da Silva SR, Moutinho LB, Dos Santos RD, Vasconcelos-Rodrigues IS, Talamini V, Fernandes FM and Fernandes MRP. 2018. Using antagonistic soil bacteria and their cell-free filtrates to control the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Phytopathology* 166:494-501. Doi:10.1111/jph.12709
- Datta M, Palit R, Sengupta C, Pandit MK and Banerjee S. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under field conditions. *Australia. Journal of Crop Science* 5(5):531-536. www.cropj.com/banerjee_5_5_2011_531_536.pdf
- Elshahawy IE, Saied NM, Abd-El-Kareem F and Morsy AA. 2017. Field application of Sclerotial micoparasites as biocontrol agents to *Stromatinia cepivora*, the cause of onion White rot. *Journal of Plant Pathology* 99(2):391-401. Doi:10.4454/jpp.v99i2.3888
- Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R y Huante P. 2013. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias. Una revisión. *Universidad Autónoma de México. Revista de Fitotecnia Mexicana* 36(3):251-258. www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v36n3/v36n3a10.pdf
- FRAC-Fungicide resistance action committee. 2018. Code List©. pp.1-14. www.phi-base.org/images/fracCodeList.pdf (consulta, noviembre 2018).
- Glick RB. 2012. Plant growth promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Hindawi publishing corporation, Scientifica* ID-963401 p.15. Doi:10.6064/2012/963401
- Glick RB. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169:30-39. Doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
- Glickmann E and Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for synodic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2):793-796. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388360/pdf/hw0793.pdf
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS and Patra JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture.

- Microbiological Research 206:131-140. Doi:10.1016/j.micres.2017.08.016
- Gutiérrez CO, Navarro ILF, Loeza LPD, Del Río ROG y Jiménez MR. 2017. Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. *Nova Scientia* 9(19):97-112. Doi:10.21640/ns.v9i19.957
- Hussain W, Elzaawely AA, El Sheery NI, Ismail AA and El-Zahaby HM. 2017. Biological control of onion white rot disease caused by *Sclerotium cepivorum*. *Environment, Biodiversity & soil Security* 1:101-107. Doi:10.21608/JENVBS.2017.1547.1008
- Jayakumar AK, Krishna A, Mohan M, Nair CI and Radhakrishnan EK. 2018. Plant growth enhancement, disease resistance, 1. and elemental modulatory effects of plant probiotic endophytic *Bacillus* sp FcL. *Probiotics Antimicrob Proteins* 1-9. Doi:10.1007/s12602-018-9417-8
- Klein JM, Loper JE and Stockwell VO. 2017. Influence of endogenous plasmids on phenotypes of *Pantoea vagans* Strain C9-1 associated with epiphytic fitness. *Journal of Plant Pathology* 99:81-89. Doi:10.4454/jpp.v99i0.3914
- Kumar GP, Kumar De T and Kanti MT. 2015. Production and etabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legume *Neptunia oleracea* Lour. *Journal of Botany* 1-11. Doi:10.1155/2015/575067
- Kumbhar VR, Mane, SR, Birajdar GM, Bansode SA, Swami CS and Bhale UN. 2018. Physicochemical characterization and population dynamics of mycoflora in infected rhizosphere soil of onion white rot caused by *Sclerotium cepivorum*. *Internationa Journal of current Microbiology and Applied Sciences* 7(8):3771-3780. Doi:10.20546/ijcmas.2018.708.384
- Latif KA, Ahmed HB, Elyassi A, Ali S, Al-Hosni K, Hussain J, Al-Harrasi A and In-Jung L. 2016. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solarium lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology* 19(3):58-64. Doi:10.1016/j.ejbt.2016.02.001
- Louden CB, Haarman D and Lynne MA. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education* 12(1):51-53. Doi:10.1128/jmbe.v12i1.249
- Luna ML, Martínez PR, Hernández IM, Arvizu MSM y Pacheco AJR. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(1):63-69. www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v36n1/v36n1a7.pdf
- Mahmood NS, Ahmad M, Zahir AZ, Javaid A and Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology advances* 32(2):429-448. Doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.005
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez M y Borges-Gómez LC. 2016. *Bacillus* spp. en el control de marchitez causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3):208-222. Doi:10.18781/R.MEX.FIT.1603-1.
- Moreno RA, García MV, Reyes CJL, Vázquez AJ y Cano RP. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20(1): 68-83. Doi:10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707
- Ortega-Aguilar BL, Alarcón A and Ferrera-Cerrato R. 2011. Effect of potassium bicarbonate on fungal growth and sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and its interaction with *Trichoderma*. *Revista Mexicana de Micología* 33:53-61. www.redalyc.org/articulo.oa?id=88319884007
- Paredes-Escalante JE, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Sañudo-Barajas JA y Valdez-Torres JB. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicerarietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(1):27-35. www.redalyc.org/articulo.oa?id=61211414004
- Reveles-Hernández M, Velázquez-Valle R, Reveles-Torres LR y Cid-Ríos JA. 2014. Guía para la producción de cebolla en Zacatecas. Folleto Técnico No. 62. Campo experimental Zacatecas, CIRNOCINIFAP, Calera, Zac., México. 40. www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/prodCebolla.pdf
- Rivera-Méndez W, Zúñiga-Vega C y Brenes-Madriz J. 2016. Control biológico del hongo *Sclerotium cepivorum* utilizado *Trichoderma asperellum* en el cultivo de ajo en Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 41-50. Doi:org/10.18845/tm.v29i7.2704
- Rodríguez GCA, Bultrago JE, Betancurt AD y Lara CR. 2017. Actividad antagonista de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*: un aporte a la agricultura sostenible. *Revista Nova* 3:9-19. http://revistas.sena.edu.co/index.php/rnova/article/view/1515/1691
- Sánchez LDB, Pérez PJV y David HHA. 2016. Efecto de la PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18(1):65-72. Doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50413
- Sarmiento GA y Velandía MJ. 2013. Evaluación de hongos y bacterias aislados de gallinaza en biocontrol de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Ciencia y Agricultura* 10(2):37-43. Doi:10.19053/01228420.2839
- Sarti GC y Miyazaki SS. 2013. Actividad antifúngica de Extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de Soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Agrociencia* 47(4):373-383. www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n4/v47n4a6.pdf
- Schwyn B y Neilands JB. 1987. Ensayo químico universal para la detección y determinación de sideróforos. *160(1):47-56. Doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9*
- Soto CF, Tramón PC, Aqueveque MP, and de Bruijn J. 2018. Antagonist microorganisms that inhibit the development of post-harvest pathogens in lemons (*Citrus limon* L.). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Science* 34(2):173-184. Doi:10.4067/S0719-38902018005000406
- Vega-Celedón P, Canchignia MH, González M y Seeger M. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Topicales*. 37: 33-39. Doi:10.13140/RG.2.1.5158.3609
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA y Estrada-Alvarado MI. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bio-

- seguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1):95-130. Doi:10.18781/R.MEX.FIT.1706-5
- Vimard B, Leggett ME and Rahe JE. 1986. Rapid isolation of Sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil by sucrose centrifugation. The American Phytopathology Society 76(4):465-467. www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n04_465.PDF
- Vurukonda SS, Vardharajula S, Shrivastava M and SkZ A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research 184: 13-24. Doi:10.1016/j.micres.2015.12.003

Inhibition of fungal endo-1,3- β -glucanase by phenols isolated from *Turnera diffusa*: an alternative for conventional antifungals

Inhibición de endo-1,3- β -glucanasa fúngica por compuestos fenólicos aislados de *Turnera diffusa*: una alternativa para antifúngicos convencionales

Paulina Tapia-Quirós, Miguel Ángel Martínez-Téllez, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México; **Graciela Dolores Ávila-Quezada**, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Ciudad Universitaria s/n. Chihuahua, Chihuahua, 31313, México; **Irasema Vargas-Arispuro***, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México. *Corresponding author: iris@ciad.mx

Recibido: 14 de Noviembre, 2019.

Aceptado: 19 de Diciembre, 2019.

Tapia-Quirós P, Martínez-Téllez MA, Ávila-Quezada GD and Vargas-Arispuro I. 2020. Inhibition of fungal endo-1,3- β -glucanase by phenols isolated from *Turnera diffusa*: an alternative for conventional antifungals. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 160-169.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-3

Primera publicación DOI: 26 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 26, 2019.

Abstract. The fungal enzyme endo-1,3- β -glucanase plays a physiological role in morphogenetic processes during development and differentiation in some fungi. Additionally, this enzyme has been implicated in fungal attack during fungus-plant interactions. Therefore, fungal endo-1,3- β -glucanase has been used as a target site for the directed search of antifungal compounds. Using

Resumen. La enzima endo-(1,3)- β -glucanasa tiene una función fisiológica en los procesos morfo-genéticos durante el desarrollo y diferenciación en algunos hongos. Adicionalmente, esta enzima ha sido implicada durante el ataque de hongo en la interacción hongo fitopatógeno-planta. Por lo que la endo-(1,3)- β -glucanasa fúngica, se ha utilizado como sitio-objetivo para la búsqueda dirigida de antifúngicos. Utilizando un aislamiento bio-dirigido de compuestos bioactivos, se aislaron dos ácidos fenólicos de tallos de *Turnera diffusa*, los cuales inhiben la actividad de endo-(1,3)- β -glucanasa fúngica. Los compuestos identificados como apigenina y luteolina inhiben la actividad del enzima en 90 y 60%, respectivamente. Consistente con el efecto de la inhibición de la enzima fúngica, la apigenina a concentración milimolar, fue capaz de inhibir completamente la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*. Con estos resultados se infiere que

the biodirected isolation of bioactive compounds, two phenolic compounds were isolated from *Turnera diffusa* stems that inhibited the activity of fungal endo-1,3- β -glucanase. The identified compounds apigenin and luteolin inhibited the activity of the enzyme by 90 and 60%, respectively. Consistent with the inhibitory effect of the fungal enzyme, apigenin at millimolar concentrations was able to completely inhibit the spore germination of *Botrytis cinerea*. It is inferred that the antifungal action of apigenin is due to its ability to inhibit the fungal endo-1,3- β -glucanase enzyme.

Key words: antifungal, apigenin, luteolin, phenol acids.

Plant pathogenic fungi have developed resistance mechanisms to synthetic fungicides (Dooley *et al.*, 2016), which has promoted the search for new fungicide agents; moreover, fungicide agents isolated from natural sources are especially valued (Mishra *et al.*, 2010). Compounds that exert fungicidal action on a target site are of particular interest because they affect the essential processes involved in fungal growth, specifically those ones required to maintain pathogenic cell viability (Arroyo *et al.*, 2016).

The fungal cell wall is one of the most important target sites because it is a fundamental structure for the viability and pathogenicity of fungi (Arroyo *et al.*, 2016). Antagonistic microorganisms produce enzymes that degrade the components of the cell wall of other microorganisms (Mouyna *et al.*, 2013). Consequently, agents that inhibit the synthesis of fungal cell wall components must be very selective (Balasubramanian *et al.*, 2012). The cell wall of ascomycetes, basidiomycetes, deuteromycetes and some oomycetes is composed of 1,3- β -glucans, 1,6- β -glucans, chitin and proteins (Kagimura *et al.*,

la acción antifúngica de la apigenina es una consecuencia de su capacidad para inhibir la enzima endo-(1,3)- β -glucanasa.

Palabras clave: antifúngico, apigenina, luteolina, ácidos fenólicos.

Los hongos fitopatógenos han creado mecanismos de resistencia a los fungicidas sintéticos (Dooley *et al.*, 2016) y esto ha generado la búsqueda de nuevos agentes fungicidas. Además, los agentes fungicidas que se aíslan de fuentes naturales son especialmente valiosos (Mishra *et al.*, 2010). Los compuestos que ejercen acción fungicida en un sitio-objetivo son de interés porque afectan los procesos esenciales involucrados en el crecimiento de los hongos, específicamente aquellos que son necesarios para mantener la viabilidad celular del patógeno (Arroyo *et al.*, 2016).

La pared celular del patógeno es uno de los sitios-objetivo porque se trata de una estructura fundamental de la viabilidad y la patogenicidad de los hongos (Arroyo *et al.*, 2016). Los microorganismos antagonistas producen enzimas que degradan los componentes de la pared celular de otros microorganismos (Mouyna *et al.*, 2013). En consecuencia, los agentes que inhiben la síntesis de la pared celular fúngica deben ser muy selectivos (Balasubramanian *et al.*, 2012). La pared celular de los ascomycetos, basidiomycetos, deuteromycetos y algunos oomicetos está compuesta de 1,3- β -glucanos, 1,6- β -glucanasa, quitina y proteínas (Kagimura *et al.*, 2015) ordenados en una estructura multicapa. Los 1,3- β -glucanos son los polisacáridos más abundantes en la pared celular fúngica (Gastebois *et al.*, 2010; Paspaspyridi *et al.*, 2018). La reorganización estructural dinámica de la pared fúngica durante los cambios morfológicos, como el crecimiento celular (ramificación), la división celular y la germinación

2015) in a multilayered structure. 1,3- β -glucans are the most abundant polysaccharide of the fungal cell wall (Gastebois *et al.*, 2010; Papaspyridi *et al.*, 2018). The dynamic structural reorganization of the fungal cell wall during morphological changes, such as cell growth (branching), cell division and germination in filamentous fungi or budding of yeast, are morphogenetic events in which endo- β -1,3-glucanases play an essential role in the synthesis of the cell wall (Gastebois *et al.*, 2010; Hartl *et al.*, 2011). Because all of these important morphogenetic events involve the β -1,3-glucans of the fungal wall, a strategy to discover antifungal agents of natural origin is to identify substances that inhibit endo- β -1,3-glucanases at specific target sites of fungi whose cell walls contain β -glucans, specifically at the β -1,3-glucan linkage (Balasubramanian *et al.*, 2012; Mouyna *et al.*, 2016). During the search for antifungal substances in plant extracts that selectively inhibit the synthesis of the fungal cell wall, it has been previously reported that the crude extracts of *Turnera diffusa*, effectively inhibited the activity of endo-1,3- β -glucanase (Vargas-Arispuro *et al.*, 2017). Therefore, this work was focused on the identification of the components from crude extract of *T. diffusa* that have the inhibitory effect on the fungal endo-1,3- β -glucanase activity.

To reach this objective, leaves and small stems of *T. diffusa* (Passifloraceae), were collected from natural populations located near to Tonichi Sonora (28° 35' 56" N, 109° 33' 56" W).

Plant samples were identified the Botanical Herbarium of the Sonora University (Mexico), and a voucher specimen was deposited at the herbarium. The leaves and small stems were separated and air-dried at room temperature for two weeks. Dried material (500 g of leaves or 300 g of small stems) was macerated in methanol (1 L), at room temperature (25 °C) for 7 days in darkness. The filtrates of each extract were evaporated to dryness

en hongos filamentosos o en la gemación en la levadura, son eventos morfogénéticos en los que las endo- β -1,3-glucanasas desempeñan un papel esencial en la síntesis de la pared celular (Gastebois *et al.*, 2010; Hartl *et al.*, 2011). Por todos estos importantes eventos morfogénéticos en los cuales los β -1,3-glucanos de la pared fúngica están implicados, una estrategia para descubrir agentes antifúngicos de origen natural, es la búsqueda de sustancias inhibitoras de endo- β -1,3-glucanasas como un sitio-objetivo específico de los hongos cuyas paredes celulares contienen β -glucanos, específicamente en el enlace β -1,3-glucano (Balasubramanian *et al.*, 2012; Mouyna *et al.*, 2016). Durante la búsqueda de sustancias antifúngicas en extractos vegetales que inhiben de manera selectiva la síntesis de la pared celular fúngica, con anterioridad se han reportado que los extractos crudos de *Turnera diffusa* inhiben de manera eficaz la actividad de la endo-1,3- β -glucanasa (Vargas-Arispuro *et al.*, 2017). Por tanto, el presente trabajo se concentró en la identificación de los componentes del extracto crudo de *T. diffusa*, que tiene un efecto inhibitor de la actividad de la endo-1,3- β -glucanasa. Para lograr este objetivo, se recolectaron hojas y tallos pequeños de *T. diffusa* (Passifloraceae) de poblaciones naturales en un sitio cercano a Tonichi, Sonora (28° 35' 56" N, 109° 33' 56" O).

Las muestras fueron identificadas en el Herbario Botánico de la Universidad de Sonora (México) y se depositó una de las muestras en el herbario. Las hojas y los tallos fueron separados y secados al aire a temperatura ambiente por dos semanas. Una vez seco (500 g de hojas o 300 g de tallos), fueron macerados en metanol (1 L), a temperatura ambiente (25 °C) por 7 días, en obscuridad. Los filtrados de cada extracto fueron evaporados a 40 °C bajo presión reducida (450 mmHg) hasta que se eliminó todo el solvente. El residuo viscoso que se obtuvo se denominó extracto crudo de hojas o extracto

at 40 °C under reduced pressure (450 mmHg). The viscous residue resulted, were called the crude extract of leaves or crude extract of stems of *T. diffusa*. The effect of the crude extract on endo-1,3-β-glucanase (*Trichoderma* sp, SIGMA) activity was determined using laminarin (*Laminaria digitata*, SIGMA) by coupled procedure previously described by Vargas-Arispuro *et al.* (2017). The procedure was carried out in 250 μL of a reaction mixture containing 100 mM potassium acetate buffer (pH 5.0), 0.5% (w/v) laminarin, 10 μL of endo-β-1,3-glucanase (0.05 U) and 50 μL of plant crude extract (3 mg mL⁻¹) or pure compounds (10 and 25 mM). The reaction was run for 40 min at 37 °C and then stopped by boiling for 5 min. The amount of reducing sugars released was measured with a spectrophotometer (BioSpec-1601) at 540 nm. Enzyme and substrate blanks were also included. A calibration curve with glucose was used. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the release 1 μmol of glucose equivalent per minute under the reaction conditions used. The following equation was used to calculate the enzyme activity. Units mL⁻¹ of enzyme = (μM of glucose released) (0.410) / (40)(0.01)(0.01), where 0.410 is the total volume of the sample in mL; 40 is the reaction time in min; 0.01 is the volume of the enzyme used in mL and 0.01 is the adjustment volume of the colorimeter in mL. Protein concentrations were determined by the Bradford method, with bovine serum albumin as the standard.

The active compounds in the plant extract were purified by chromatographic techniques. For this procedure, plant crude extract (100 mg) was dissolved in 5 mL of methanol for analysis by preparative thin-layer chromatography (TLC). Preparative TLC plates coated with a GF-254 fluorescent silica gel 60 (5 x 20 cm, 250 μm, EM, Science, Germany) and spotted with plant

crudo de tallos de *T. diffusa*. El efecto del extracto crudo sobre la actividad de la endo-1,3-β-glucanasa (*Trichoderma* sp, SIGMA) se determinó utilizando laminarina (*Laminaria digitata*, SIGMA) mediante el procedimiento acoplado anteriormente descrito por Vargas-Arispuro *et al.* (2017). El procedimiento se realizó en 250 μL de una mezcla de reacción preparada con 100 mM de solución amortiguadora de potasio (pH 5.0), 0.5% (w/v) laminarina, 10 μL de endo-β-1,3-glucanasa (0.05 U) y 50 μL de extracto vegetal crudo (3 mg mL⁻¹) o de compuestos puros (10 y 25 mM). La reacción se corrió durante 40 min a 37 °C y luego se detuvo por ebullición por 5 min. La cantidad de azúcares reductores obtenida se midió con un espectrofotómetro (BioSpec-1601) a 540 nm. También se incluyeron los controles de la enzima y el sustrato. Se utilizó una curva de calibración con glucosa. Una unidad de la actividad enzimática se definió como la cantidad de la enzima que catalizó la liberación de 1 μmol de glucosa equivalente por minuto en las condiciones bajo las cuales se produjo la reacción. Para calcular la actividad de la enzima se utilizó la siguiente ecuación: unidades mL⁻¹ de enzima = (μM de glucosa liberada) (0.410) / (40)(0.01)(0.01), donde 0.410 es el volumen total de la muestra en mL; 40 es el tiempo de reacción en min; 0.01 es el volumen utilizado de la enzima en mL y 0.01 es el volumen ajustado del colorímetro en mL. Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el método Bradford, con albúmina bovina como estándar.

Los compuestos activos en el extracto vegetal fueron purificados mediante técnicas cromatográficas. Para este procedimiento, cada uno de los extractos crudo (100 mg) se disolvió por separado en 5 mL de metanol para su análisis mediante cromatografía de capa fina preparativa (TLC), recubiertas con gel silica fluorescente 60 GF-254 (5 x 20 cm, 250 μm, EM, Science, Alemania) en las que se colocaron muestras de extracto vegetal

crude extract in methanol were developed in dichloromethane. The TLC plate was marked under ultraviolet (UV) light at 254 nm, and each band was carefully scraped off the plate. The scrapings were dissolved in methanol, filtered through filter paper (Whatman N° 1) and centrifuged at 5,000 rpm for 10 min. The methanol filtrates of each band were evaporated to dryness at 40 °C under reduced pressure. A portion of each residue from the separated TLC bands was dissolved (1:1 w/v) in methanol and subjected to an enzyme assay. The fraction that retained the compounds with inhibitory activity was subjected to high pressure liquid chromatography (HPLC) purification process (1260 AgilentTechnology, USA) on an instrument coupled to a photodiode array detector (HP-1260, Germany), with a Nucleosil 120 C18 (250 x 4 mm, 5 µ, Cronus) reverse-phase column. HPLC separation was performed using a gradient program with the mobile phase of 1% formic acid (solvent A) and 100% acetonitrile (Solvent B) and beginning with 80% A in 40 min, 50% A in 60 min, 10% A in 80 min and 0% A in 85 min. The flow rate was 0.3 mL min⁻¹, detection was performed at 254, 280 and 320 nm, and spectral data were collected from 240 to 550 nm. Subfractions were collected under 254 nm and subjected to the enzyme assay. The compounds were identified by comparing the data with the UV spectrum of pure compounds from a database of phenolic compounds.

The antifungal evaluation of both plant extracts and the isolated compounds was carried out on spores from *Botrytis cinerea* (a fungus isolated from grape, GenBank accession number AY568636) grown at 25 °C on potato dextrose agar (PDA, Difco, Sparks, MD, USA) in 9-cm diameter petri dishes until sporulation. The spore suspension was prepared by adding 5 mL of sterile water with 0.01% Tween 20 to each plate, and the surface was scraped gently with a glass rod to release spores.

crudo en metanol, fueron procesadas en diclorometano. La placa TLC se reveló con luz ultravioleta (UV) a 254 nm, y cada banda fue cuidadosamente separada de la placa. Los raspados se disolvieron en metanol, se filtró con papel filtro (Whatman N° 1) y se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min. Los filtrados recuperados fueron evaporados at 40 °C a presión reducida hasta que se eliminó todo el solvente. Una porción de cada fracción fue disuelta (1:1 p/v) en metanol para la evaluación enzimática. La fracción que retuvo los compuestos inhibidores, fue sometida proceso de purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (1260 AgilentTechnology, EE. UU), acoplado a un detector de arreglo de diodos (HP-1260, Germany), con una columna Nucleosil 120 C18 (250 x 4 mm, 5 µ, Cronus). La separación por HPLC se realizó utilizando un programa de gradientes con la fase móvil de ácido fórmico al 1% (solvente A) y acetonitrilo al 100% (solvente B) y comenzando con 80% de A en 40 min, 50% de A en 60 min, 10% de A en 80 min y 0% de A en 85 min. La tasa de flujo fue de 0.3 mL min⁻¹, la detección se llevó a cabo a 254, 280 y 320 nm, y se obtuvieron datos espectrales de 240 a 550 nm. Las subfracciones se recolectaron a 254 nm y se sometieron a un ensayo enzimático. Los compuestos activos se identificaron por comparación de espectro UV de compuestos puros de una base de datos de compuestos fenólicos.

La evaluación antifúngica de ambos extractos vegetales y los compuestos aislados se realizó en esporas de *Botrytis cinerea* (un hongo aislado de uva, número de accesión AY568636 del GenBank) cultivadas a 25 °C en un medio de papa-dextrosa-agar (PDA, Difco, Sparks, MD, EE. UU.) en cajas Petri de 9 cm de diámetro hasta la esporulación. La suspensión de esporas se preparó agregando 5 mL de agua estéril con 0.01% de Tween 20 a cada caja, y la superficie se raspó ligeramente con una varilla de vidrio para liberar las esporas. La suspen-

The water-spore suspension was filtered through glass wool to remove the mycelium. The collected filtrate was centrifuged at 5000 x g for 15 min and adjusted to a density of 1×10^4 spores mL^{-1} using a hemacytometer. The spore germination assay was performed on microwell strips (Nalge, Nunc, Naperville, IL, USA). Sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco, Sparks, MD, USA) (900 μL) containing HPLC fractions (50 and 100 mM) or water (control) was pipetted into each well of a strip of 8 wells per treatment. A spore suspension (100 μL) containing $\sim 100 \pm 15$ spores of *B. cinerea* was added, the well contents were gently mixed, and the strips were incubated at 25 °C. The germinated spores in each well were counted by microscopic examination until the control spores reached 100% germination. These bioassays were conducted four times. The data were analyzed by analysis of variance of one way using NCSS software (version 2007). The means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.01$).

The effect of the plant crude extracts on fungal endo-1,3- β -glucanase is shown in Figure 1. The stem extract showed greater inhibition of enzymatic activity than the leaf extract. Thus, by preparative thin layer chromatography, the crude extract from stems was separated, and four fractions were obtained (Table 1). After evaluating the effect of the fractions on the enzyme, it was determined that the inhibitory compounds of the enzyme were retained in fraction 2 (Table 1). The inhibitory effect of this fraction against fungal endo-1,3- β -glucanase displayed the same inhibition percentage to that of the crude extract of stems (Figure 1).

Based on these results, were separated the compounds from fraction 2 using HPLC. Fifteen identified compounds were classified as phenolic compounds. The evaluation of the effect of each isolated compound on the activity of the fungal endo-1,3- β -glucanase revealed that only 2

sión agua-esporas fue filtrada sobre fibra de vidrio y el filtrado fue centrifugado a 5000 g por 15 min y ajustado a una densidad de 1×10^4 esporas mL^{-1} , usando un hematocitómetro. El ensayo de germinación de esporas se realizó en tiras de micropocillos (Nalge, Nunc, Naperville, IL, EE. UU.). Con una pipeta, se agregó caldo Sabouraud dextrosa (SDB) (Difco, Sparks, MD, EE. UU.) (900 μL) que contenía fracciones de HPLC (50 y 100 mM) o agua (control) a cada pocillo de una tira de 8 pocillos por tratamiento. Se agregó la suspensión de esporas (100 μL) que contenía $\sim 100 \pm 15$ esporas de *B. cinerea*, el contenido de los pocillos se mezcló suavemente, y se incubaron a 25 °C. Las esporas germinadas en cada pocillo se cuantificaron mediante un examen microscópico hasta que las esporas control alcanzaron el 100% de germinación. Los bioensayos se realizaron cuatro veces. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía con el software NCSS versión 2007. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.01$).

El efecto de los extractos vegetales crudos sobre la endo-1,3- β -glucanasa fúngica se muestra en la Figura 1. El extracto de tallos mostró mayor inhibición de la actividad enzimática que el extracto de hojas. Por tanto, se separó el extracto crudo de los tallos, mediante cromatografía de capa fina preparativa, y se obtuvieron cuatro fracciones (Cuadro 1). Después de evaluar el efecto de las fracciones sobre la enzima, se determinó que los compuestos inhibidores de la enzima fueron retenidos en la fracción 2 (Cuadro 1). El efecto inhibitorio de esta fracción contra la endo-1,3- β -glucanasa fúngica mostró el mismo porcentaje de inhibición que el del extracto crudo de los tallos (Figura 1).

Con base en estos resultados, se separaron los compuestos de la fracción 2 mediante HPLC. Quince de los compuestos identificados fueron clasificados como compuestos fenólicos. La evaluación del efecto de cada compuesto aislado sobre la

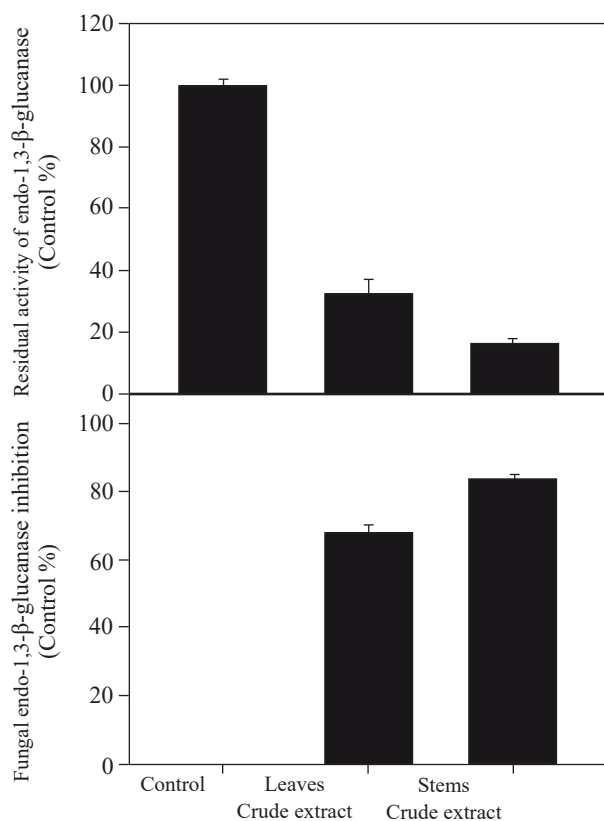


Figure 1. Effect of the leaf and stem crude extracts of *Turnera diffusa* on the activity of fungal endo-1,3-β-glucanase evaluated at 3 mg mL⁻¹ expressed as a percentage of inhibition related to control (means ± SD, n=6).

Figura 1. Efecto de los extractos crudos de hojas y tallos de *Turnera diffusa* en la actividad fúngica de la endo-1,3-β-glucanasa evaluado a 3 mg mL⁻¹, expresado como porcentaje de inhibición con respecto al control (media ± SD, n=6).

actividad de la endo-1,3-β-glucanasa fúngica reveló que solo dos compuestos, identificados como luteolina y apigenina, evaluados a 25 mM, inhibieron la enzima fúngica en 60 y 89%, respectivamente. Los otros 13 compuestos no tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima fúngica (Cuadro 2). La apigenina y la luteolina mostraron efectos inhibitorios sinérgicos sobre la actividad de la enzima, y cuando se evaluaron juntas a la misma concentración mostraron 100% de efecto inhibitorio de la enzima con respecto al control (Cuadro 2). En estudios anteriores se ha reportado que la actividad antifúngica de algunos extractos de plantas se debe al contenido de compuestos inhibidores endógenos de tipo fenólicos (Kaushik *et al.*, 2015); algunos de estos compuestos inhiben la actividad de las células. La endo-1,3-β-glucanasa es miembro de este grupo de enzimas (Takeda *et al.*, 2015; Menget *et al.*, 2016).

El potencial fungicida de las flavonas se calculó con base en el efecto que produjeron sobre la germinación de esporas de *B. cinerea*. Los resultados muestran que la apigenina inhibió completamente la germinación de esporas a una concentración de 100 mM, en tanto que la luteolina inhibió 90% de la germinación de esporas a la misma concentración (Figura 2). Estos resultados se correlacionan con el efecto de las flavonas sobre la inhibición de

Table 1. Residual activity and inhibition of fungal endo-1,3-β-glucanase by fractions of *Turnera diffusa* stems extract obtained from preparative thin layer chromatography evaluated at 3 mg mL⁻¹ expressed as a percentage of germination related to control.

Cuadro 1. Actividad residual e inhibición de la enzima endo-1,3-β-glucanasa fúngica por fracciones de extracto de tallos de *Turnera diffusa* obtenidas mediante cromatografía de capa fina preparativa evaluadas a 3 mg mL⁻¹, expresada como porcentaje de germinación con respecto al control.

| TLC Fraction | Retention factor (Rf) | Residual activity of fungal endo-1,3-β-glucanase (%) | Inhibition of fungal endo-1,3-β-glucanase (%) |
|--------------|-----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1 | 0.7 | 100 | 0 |
| 2 | 0.5 | 15 | 85 |
| 3 | 0.3 | 97 | 3 |
| 4 | 0.2 | 100 | 0 |

compounds, identified as luteolin and apigenin, evaluated at 25 mM, were able to inhibit the fungal enzyme by 60 and 89 %, respectively. The remaining 13 compounds had no effect on the activity of the fungal enzyme (Table 2). Apigenin and luteolin showed synergistic inhibitory effects on the enzyme activity, when were evaluated together at the same concentration, they showed an inhibitory effect of the enzyme of 100 % compared to the control (Table 2). Previous works have reported that the antifungal activity of extracts of some plants is due to the content of endogenous inhibitory phenolic compounds (Kaushik *et al.*, 2015); some of these compounds inhibit the activity of cellulases. Endo-1,3- β -glucanase is a member of this group of enzymes (Takeda *et al.*, 2015; Menget *et al.*, 2016).

la actividad de la endo-1,3- β -glucanasa fúngica ($r=0.98$) (Cuadro 2) y, por tanto, es posible inferir que la apigenina tiene un mayor efecto fungicida que la luteolina. Szewczyk y Zidorn (2014) y Sarris *et al.* (2013) reportaron el aislamiento de apigenina de un extracto de *T. diffusa* en el que identificaron la apigenina como un compuesto activo que protege contra la ansiedad. Asimismo, Willer *et al.* (2019) reportaron que encontraron luteolina y apigenina en 24 compuestos fenólicos aislados de *T. diffusa* y que la apigenina tenía actividad estrogénica. La apigenina es reconocida en la medicina tradicional y alternativa porque tiene diversas actividades farmacológicas (Si *et al.*, 2009), como la inhibición de la enzima 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Choi y Kim, 2009; Hasegawa *et al.*, 2013). No existen reportes publicados sobre el efecto

Table 2. Phenolic compounds identified in the stem extract of *Turnera diffusa* and their effects on fungal endo-1,3- β -glucanase activity evaluated at 25 mM expressed as a percentage of germination related to control.

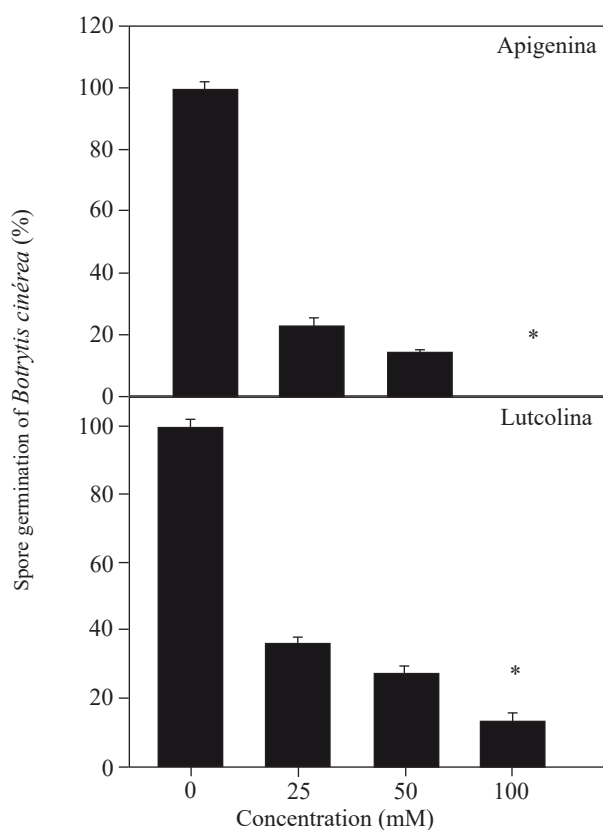
Cuadro 2. Compuestos fenólicos identificados en el extracto de tallos de *Turnera diffusa* y sus efectos en la actividad de la endo-1,3- β -glucanasa fúngica evaluada a 25 mM, expresada como porcentaje de germinación con respecto al control.

| Compound | Name | Inhibition of fungal endo-1,3- β -glucanase (%) |
|----------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1 | Hydrated catechin | 0 |
| 2 | Epicatechin | 0 |
| 3 | Luteolin | 60 |
| 4 | Kaempferol | 0 |
| 5 | Cinnamic acid | 0 |
| 6 | Quercetin | 0 |
| 7 | Trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid | 0 |
| 8 | P-coumaric acid | 0 |
| 9 | 3,4-Dihydroxycinnamic acid | 0 |
| 10 | Chlorogenic acid | 0 |
| 11 | Ferulic acid | 0 |
| 12 | Sodium 4-hydroxybenzoate | 0 |
| 13 | Trans-cinnamic anhydrous acid | 0 |
| 14 | Apigenin | 89 |
| 15 | Gallic acid | 0 |
| 3+14 | Luteolin + apigenin | 100 |

The fungicidal potential of the flavones was calculated based on their effect on the germination of *B. cinerea* spores. The results show that apigenin completely inhibited spore germination at a concentration of 100 mM, while luteolin inhibited 90 % of spore germination at the same concentration (Figure 2). These results correlated with the effect of flavones on the inhibition of the activity of fungal endo-1,3-β-glucanase ($r= 0.98$), presented in Table 2; thus, it is possible to infer

inhibidor de la apigenina en enzimas endo-1,3-β-glucanasa fúngicas; por tanto, el presente trabajo constituye el primer reporte sobre esta actividad. Con base en los resultados de esta investigación, se concluye que el compuesto fenólico de apigenina aislado de extractos de tallos de *T. diffusa* inhibe la enzima endo-1,3-β-glucanasa fúngica y, en consecuencia, disminuye la germinación de esporas de *B. cinerea*.

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



**Figure 2.** Effect of apigenin and luteolin isolated from *Turnera diffusa* on spore germination of *Botrytis cinerea*, expressed as a percentage of germination related to control (means  $\pm$  SD, n=12). Asterisks indicate significant differences (Tukey test  $p \leq 0.1$ ).

**Figura 2.** Efecto de la apigenina y luteolina aisladas de *Turnera diffusa* sobre la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*, expresado como porcentaje de germinación con respecto al control (media  $\pm$  SD, n=12). Los asteriscos indican diferencias significativas (prueba de Tukey  $p \leq 0.1$ ).

that apigenin has a greater fungicidal effect than luteolin. Szewczyk and Zidorn (2014) and Sarris *et al.* (2013) reported the isolation of apigenin from an extract of *T. diffusa*, identifying apigenin as an active compound that protects against anxiety. Additionally, Willer *et al.* (2019) reported that among the 24 phenolic compounds isolated from *T. diffusa*, luteolin and apigenin were found, and the latter exerted estrogenic activity. Apigenin is recognized in traditional and alternative medicine to have diverse pharmacological activities (Si *et al.*, 2009), including the inhibition of the 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme (Choi and Kim, 2009; Hasegawa *et al.*, 2013). There have been no published reports on the inhibitory effect of apigenin on fungal endo-1,3-β-glucanase enzymes; hence, this work is the first report of this activity. Based on these research findings, it is concluded that the phenolic compound apigenin isolated from stem extracts of *T. diffusa* inhibits the fungal enzyme endo-1,3-β-glucanase and consequently decreases the germination of *B. cinerea* spores.

## LITERATURE CITED

- Arroyo J, Farkas V, Sanz A and Cabib E. 2016. Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. *Cellular Microbiology*. 18: 1239-1250. DOI: 10.1111/cmi.12615
- Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J and Sakthivel N. 2012. Plant  $\beta$ -1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*. 34: 1983-1990. DOI: 10.1007/s10529-012-1012-6
- Choi EJ and Kim GH. 2009. Apigenin induces apoptosis through a mitochondria/caspase-pathway in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Journal of Clinical Biochemistry. and Nutrition*. 44: 260–265. DOI: 10.3164/jcbn.08-230
- Dooley H, Shaw MW, Spink J and Kildea S. 2016. The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zyoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity. *Pest Management Science*. 72: 1150-1159. DOI: 10.1002/ps.4093
- Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, Clavaud C, Coddeville B, Delepierre M, Latgé JP and Fontaine T. 2010. Characterization of a new  $\beta$ -(1–3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*. 285:2386–2396. DOI: 10.1074/jbc.M109.077545
- Hartl L, Gastebois A, Aimanianda V and Latgé JP. 2011. Characterization of the GPI-anchored Endo-(1-3)-Glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetic and Biology*. 48:185-191. DOI: 10.1016/j.fgb.2010.06.011
- Hasegawa E, Nakagawa S, Sato M, Tachikawa E and Yamato S. 2013. Effect of polyphenols on production of steroid hormones from human adrenocortical NCI-H295R cells *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 36:228-237. DOI: 10.1248/bpb.b12-00627
- Kagimura FY, da Cunha MA, Barbosa AM, Dekker RF and Malfatti CRM. 2015. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72:588-598. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.008
- Kaushik P, Andujar I, Vilanova S, Plazas M, Gramazio P, Herraiz FJ, Brar N and Prohens J. 2015. Breeding vegetables with increased content in bioactive phenolic acids. *Molecules*. 20: 18464–18481. DOI: 10.3390/molecules201018464
- Menget DD, Wang B, Ma X Q, Ji S.Q, Lu M and. Li FL.2016. Characterization of a thermostable endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase from *Caldicellulosiruptor* sp. strain F32 and its application for yeast lysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 4923-4934. DOI: 10.1007/s00253-016-7334-x
- Mishra SN, Rao Ch V, Ojha SK, Vijayakumar M and Verma A. 2010. An analytical review of plants for antidiabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Science Research*. 1:29-46. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.1(1).29-46
- Mouyna I, Aimaniand V, Hartl L, Prevost MC, Sismeiro O, Dillies M A, Jagla B, Legendre R, Coppee J.Y and Latgé JP. 2016. GH16 and GH81 family  $\beta$ -(1,3)-glucanases in *Aspergillus fumigatus* are essential for conidial cell wall morphogenesis. *Cellular Microbiology*. 18: 1285-1293. DOI: 10.1111/cmi.12630
- Mouyna I, Hartl L and Latgé JP. 2013.  $\beta$ -1, 3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*. 4:81. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00081
- Papaspyridi L M, Zerva A and Topakas E. 2018. Biocatalytic synthesis of fungal  $\beta$ -glucans. *Catalysts* 8:274. DOI: 10.3390/catal8070274
- Sarris J, McIntyre E and Camfield DA. 2013. Plant-based medicines for anxiety disorders, part 1. *CNS Drugs* 27: 207-219. DOI: 10.1007/s40263-013-0044-3
- Si D, Wang Y, Zhou YH, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li S and Fawcett JP. 2009. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drugs Metabolism and Disposition*. 37: 629-634. DOI: 10.1124/dmd.108.023416
- Szewczyk K and Zidorn C. 2014. Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana *Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 152: 424-443. DOI: 10.1016/j.jep.2014.01.019
- Takeda T, Nakano Y, Takahashi M, Konno N, Sakamoto Y, Arashida R, Marukawa Y, Yoshida E, Ishikawa T and Suzuki K. 2015. Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Euglena gracilis*. *Phytochemistry*. 116:21-27. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.05.010
- Vargas-Arispuro I, Fraijo-Martínez M, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C and Martínez-Téllez M A. 2017. Looking for natural antifungal agent: Sensitive assay to detect fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase inhibitors from crude plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35: 130-138. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-5
- Willer J, Jöhrer K, Greil R, Zidorn C and Sezai Çiçek S. 2019. Cytotoxic properties of Damiana (*Turnera diffusa*) extracts and constituents and A validated quantitative UHPLC-DAD assay. *Molecules*. 24(5):2855. DOI: 10.3390/molecules24050855.

# CP-Vero 1, white maize (*Zea mays*) synthetic variety resistant to head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) for Mexican highlands

## CP-Vero 1, variedad sintética de maíz (*Zea mays*) blanco, resistente a carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) para el altiplano de México

Carlos De León-García de Alba, Especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP.56230. \*Correo para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 09 de Octubre, 2019.

Aceptado: 26 de Noviembre, 2019.

De León-García de Alba C. 2020. CP-Vero 1, white maize (*Zea mays*) synthetic variety resistant to head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) for Mexican highlands. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 170-175.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1910-2

Primera publicación DOI: 07 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 07, 2019.

**Resumen.** En la producción de maíz, el agricultor se encuentra ante la alternativa de sembrar semilla comercial de maíz híbrido o semilla de polinización libre incluyendo variedades mejoradas o poblaciones nativas. La semilla de maíz híbrido tiene un alto costo, es necesario comprar semilla nueva para cada siembra mientras que la semilla de una variedad mejorada puede sembrarse por varios años, puede competir en rendimiento con un híbrido, es de bajo costo y puede compartirse entre agricultores. Una variedad sintética ofrece ventajas adicionales sobre una variedad mejorada común,

**Abstract.** In maize production, farmers face the alternative of planting commercial hybrid maize seed, or an open pollinated variety including an improved variety or a native local variety. Hybrid maize seed is costly, new seed has to be planted each season and seed of the desired hybrid is difficult to find, while seed of an improved open pollinated variety can be planted for several years, at par in grain yield with a hybrid, it is of low cost, and can be shared between farmers. The advantage of an open pollinated synthetic variety over a normal improved open pollinated variety is a higher grain yield, more uniformity in flowering time and phenotype. This work presents activities resulting in obtaining the open pollinated synthetic variety with white endosperm CP-Vero 1 following an  $S_1$  recurrent selection program for good agronomic characters and resistance to head smut.

**Key words:** Genetic resistance,  $S_1$  recurrent selection.

con buen rendimiento de grano y uniformidad en floración y fenotipo. Este trabajo presenta actividades involucradas en la obtención de la variedad sintética de maíz de endospermo blanco CP-Vero 1 siguiendo un programa de selección recurrente de líneas  $S_1$  para obtener buenas características agronómicas y resistencia al carbón de la espiga.

**Palabras clave:** Resistencia genética, selección  $S_1$  recurrente.

La enfermedad del carbón de la espiga, causada por el basidiomiceto *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, se ha diseminado por varias regiones del país en localidades de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes, pero su distribución puede ser aún más extensa (Aquino-Martínez *et al.*, 2011). Recientemente, se ha reportado en los valles del Mezquital y de Toluca en donde se siembran semillas de maíces híbridos que han mostrado susceptibilidad a la enfermedad. La enfermedad invade la planta en forma sistémica y los síntomas de su infección son visibles con daños en mazorca y/o la espiga (Figura 1).

Como parte del control de ésta enfermedad, se inició el proyecto para generar variedades de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y con resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica para el control de ésta y otras enfermedades en los cultivos (Pandey y Gardner, 1992).

El programa de mejoramiento para desarrollo de una variedad sintética que contenga caracteres agronómicos deseables y resistencia genética al carbón de la espiga se inició con el desarrollo de una población de maíz con endospermo blanco con amplia base genética. Esta población se formó

Head smut, a disease caused by the *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* basidiomycete, has quickly spread across several Mexican regions, including the states of Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas and Aguascalientes, but the disease could spread even farther (Aquino-Martínez *et al.*, 2011). Recently, it has been detected in the Mezquital and Toluca valleys where hybrid maize seed that has shown to be susceptible to the disease is planted. The disease invades the plant systemically and its visible infection symptoms are damage to maize ears and/or tassels (Figure 1).

As part of head smut control management, a project was launched to develop open-pollinated maize varieties with good agronomic traits and genetic resistance to the disease. Genetic resistance is considered the most effective and economic method for controlling this and other crop diseases (Pandey and Gardner, 1992).

The improvement program responsible for developing a synthetic variety containing desirable agronomic traits and genetic resistance to head smut started by developing a broad-based white endosperm maize population. The population was formed by recombining a total of 45 samples collected in the Mexican highlands in isolated plots during two cycles; the collection included commercial hybrids, as well as improved and native materials, with good agronomic performance. To avoid self-fertilization, the collected germplasm was recombined by planting each component in 2 rows 5 m long that were detasseled, and a balanced mixture of all entries was planted as male every 2 rows. The recombination plots were established in a farmer's land in the ejido Santa Teresa Tiloxtoc, Valle de Bravo, State of Mexico (19° 13' N, 100° 107' W, 1740 masl). After two recombining cycles, the base population (C0) was formed, and from this, a  $S_1$  recurrent selection program



**Figura 1. Signos y síntomas del carbón de la espiga en partes reproductivas del maíz.  
Figure 1. Signs and symptoms of head smut in the reproductive parts of a maize plant.**

recombinando en lotes aislados, por dos ciclos, un total de 45 colectas de maíces del altiplano de México con buen comportamiento agronómico, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas. Para evitar autofecundaciones, el germoplasma colectado se recombinó sembrando cada componente en 2 surcos de 5 m de largo que se desespigaron y cada 2 surcos se sembró con una mezcla balanceada de todas las entradas como macho. Los lotes de recombinación se establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, México (19° 13' N, 100° 107' W, 1740 msnm). Después de dos ciclos de recombinación se formó la población base (C0), sobre la cual se inició un programa de selección recurrente de  $S_1$  (Pandey y Gardner, 1992), autofecundando aproximadamente 400 plantas deseables en cada ciclo de mejoramiento y generando semilla  $S_1$  en cada ciclo. La semilla de familias  $S_1$  seleccionadas se inoculó con una suspensión acuosa de 1%

was started (Pandey and Gardner, 1992) by self-pollinating approximately 400 desirable plants in each improvement cycle and obtaining  $S_1$  seed in each cycle. Seed from the selected  $S_1$  families was inoculated with 1% carboxymethyl cellulose aqueous suspension with  $1.7 \times 10^7$  teliospores  $\text{mL}^{-1}$  from the pathogen (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). The inoculated seed was planted, one ear per row without replications, in a greenhouse established in the ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hidalgo (20° 11' N, 99° 14' W, 2100 masl), where the disease occurs under natural conditions.

Approximately 33% of the  $S_1$  lines that were inoculated and selected based on their desirable agronomic traits and disease resistance were recombined plant to plant, in order to start a new improvement cycle of the base population. Simultaneously, during each evaluation cycle of  $S_1$  lines, groups of 10-12 lines with a desirable specific trait (uniform flowering date, plant and ear height,



de carboximetilcelulosa con  $1.7 \times 10^7$  teliosporas  $\text{mL}^{-1}$  del patógeno (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). La semilla inoculada se sembró, mazorca por surco, sin repeticiones, en un vivero establecido en el ejido Cinta Larga, en Mixquiahuala, Hidalgo ( $20^\circ 11' \text{ N}$ ,  $99^\circ 14' \text{ W}$ , 2100 msnm) en donde se presenta la enfermedad en condiciones naturales.

Aproximadamente 33% de las líneas  $S_1$  inoculadas y seleccionadas de acuerdo a caracteres agronómicos deseables y resistencia a la enfermedad, se recombinaron planta a planta para iniciar un nuevo ciclo de mejoramiento de la población base. Simultáneamente, en cada ciclo de evaluación de líneas  $S_1$ , se seleccionaron grupos de 10-12 líneas con un carácter específico deseable, como son uniformidad en fecha de floración, altura de planta y mazorca, precocidad, etc. Estos grupos de líneas se cruzaron mediante el esquema dialélico con cruces directas para generar la  $F_1$  de nuevas variedades sintéticas experimentales que se avanzaron a  $F_2$  para ser incluidas en ensayos agronómicos con otras variedades obtenidas en ese u otros ciclos, e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano. Este proceso de mejoramiento poblacional es continuo.

En ensayos de rendimiento establecidos con semilla  $F_2$  de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo  $C_3$ - $S_1$ , la variedad experimental Blanca 13 fue seleccionada por sus caracteres sobresalientes, incluyendo mejor calidad y aspecto de grano y llenado de mazorca sobre otros materiales considerados en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2017, ésta variedad seleccionada se sometió ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) para aprobación como nueva variedad denominada CP-Vero 1, fue entregada al Colegio de Postgraduados al que se otorgó el título de obtentor número 1831. Semilla certificada de ésta variedad se encuentra en producción en lotes de agricultores con buenos resultados (Figura 2).

early maturity, among others) were selected, and then crossed using the diallel scheme with direct crosses to generate  $F_1$  of new experiment synthetic varieties that were advanced to  $F_2$  to be included in agronomic trials along with other varieties obtained from that or another cycle, and commercial hybrids, and thus measure their agronomic performance and grain yield. The population improvement is continuous.

In yield trials using  $F_2$  seed of the experiment varieties obtained from lines of the  $C_3$ - $S_1$  cycle, Blanca 13 was selected because of its outstanding traits, such as better quality and aspect, as well as ear filling, compared to other materials included in the same trials (Table 1). In 2017, this variety was submitted to the National Service Seed Inspection and Certification (SNICS, for its acronym in Spanish) for approval as a new variety known as CP-Vero 1, and delivered to Colegio de Postgraduados, which holds the breeder's title number 1831. Certificate seed of this variety is being produced in farmers' plots with good results (Figure 2).

CP-Vero 1 is a high yielding, white grain synthetic maize variety, with a high level of resistance to head smut and low cost, that can be planted for several years. The impact of this project on society is farmers' income increase, because of the low cost of the seed and increased maize productivity, as a result of the variety's good yield and disease resistance, which prevents the disease from spreading. This synthetic variety is registered with SNICS and owned by Colegio de Postgraduados for distribution and commercialization.

The  $S_1$  recurrent selection improvement program established as part of this project involves the improvement of an initial genetic broad-based population to obtain  $S_1$  lines whose agronomic performance and resistance to head smut are evaluated using artificial inoculations of the pathogen, thus contributing to the development of

**Cuadro 1. Promedio de dos ensayos agronómicos de evaluación de caracteres agronómicos de tres variedades experimentales y un testigo en dos localidades. 2015. (Segundo ensayo para registro en el SNICS).**  
**Table 1. Average from two agronomic trials of three experiment varieties and one check in two sites. 2015. (Second trial to be registered with SNICS).**

| Origen<br>Toluca 15 | Rendimiento<br>(tha <sup>-1</sup> ) | Días<br>polen | Días<br>estigmas | Altura planta<br>(cm) | Altura mazorca<br>(cm) |
|---------------------|-------------------------------------|---------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| Blanca 13           | 8.6 a <sup>z</sup>                  | 85 a          | 89 a             | 198 b                 | 103 ab                 |
| Test.BG1384W        | 8.1 ab                              | 86 a          | 89 a             | 204 a                 | 101 ab                 |
| Blanca 18           | 8.6 a                               | 86 a          | 89 a             | 201 ab                | 95 a                   |
| Blanca 7            | 8.5 a                               | 85 a          | 89 a             | 201 ab                | 95 a                   |
| Media               | 8.4                                 | 85.5          | 88.7             | 201.8                 | 99.2                   |
| CV (%)              | 13.9                                | 1.29          | 1.56             | 2.9                   | 4.99                   |
| DMS (0.05 %)        | 1.1                                 | 2.2           | 2.7              | 11.9                  | 9.9                    |

<sup>z</sup> Letras similares, estadísticamente los tratamientos son iguales / <sup>z</sup> Similar letters indicate that the treatments are statistically equal.



**Figura 2. Lote de producción de semilla certificada de la variedad sintética CP-Vero 1. Huejotzingo, Puebla 2019.**  
**Figure 2. Certified seed production plot of CP-Vero 1 synthetic variety. Huejotzingo, Puebla, 2019.**

La variedad sintética de maíz CP-Vero 1 es de alto rendimiento, de grano blanco, con resistencia genética al carbón de la espiga, es de bajo costo y se puede volver a sembrar por varios años. El impacto de éste proyecto hacia la sociedad, es el incremento de ingreso del agricultor debido al bajo costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad, con lo que se evita su diseminación. Esta variedad sintética está registrada en el SNICS y es propiedad del Colegio de Postgraduados para su distribución y comercialización.

El programa de mejoramiento de selección  $S_1$  recurrente implementado involucra el mejoramiento de una población inicial con amplia base genética de la que se generan líneas  $S_1$ , que se evalúan por comportamiento agronómico y resistencia al carbón de la espiga usando inoculaciones artificiales del patógeno, permitiendo la generación de nuevas variedades experimentales en cada ciclo de mejoramiento.

new experiment varieties during each improvement cycle.

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

LITERATURA CITADA

- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A y Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. Revista Mexicana de Fitopatología 29:39-49. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a4.pdf>
- Pandey S and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. Advances in Agronomy 28:1-87. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60935-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60935-9)
- Quezada-Salinas A, De León-García de Alba C, Hernández-Anguiano AM y Nava-Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kuhn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana de Fitopatología 31:80-90. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a1.pdf>

CP-Hilda 2, new yellow grain synthetic maize (*Zea mays*) variety resistant to horse's tooth (*Claviceps gigantea*) for the Mexican highlands

CP- Hilda 2, nueva variedad sintética de maíz (*Zea mays*) de grano amarillo y resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México

Carlos De León-García de Alba, Especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 01 de Octubre, 2019.

Aceptado: 05 de Diciembre, 2019.

De León-García de Alba C. 2020. CP-Hilda 2, new yellow grain synthetic maize (*Zea mays*) variety resistant to horse's tooth (*Claviceps gigantea*) for the Mexican highlands. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 176-181.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1910-1

Primera publicación DOI: 14 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 14, 2019.

Resumen. En producción de maíz, la semilla de variedades de polinización libre ofrecen al agricultor obtener un precio más bajo que la semilla de híbridos comerciales, no es necesario comprar semilla nueva cada año, por su estabilidad genética puede sembrarse varios años, ofrecen más estabilidad en rendimiento de grano y tipo de planta, es más fácil de conseguir, puede competir en rendimiento con un híbrido y puede propagarse entre agricultores. El presente trabajo es resultado de actividades desarrolladas para la obtención de la variedad sintética de maíz de endosperma amarillo CP-Hilda 2,

Abstract. In maize production, seed of open pollinated varieties offers to the farmer a seed at lower cost than seed of commercial hybrid seed, it is not necessary to buy new seed every year, due to their genetic stability they can be planted for several years, it is easy to obtain, can compete in yield with hybrids, and can be propagated among farmers. Also, synthetic varieties offer more stability in grain yield and plant type. This work is the result of activities developed to obtain the yellow grained maize synthetic variety CP-Hilda 2, with good agronomic performance and genetic resistance to "horse's tooth" disease, following a S_1 recurrent selection program.

Key words: CP-Hilda 2, synthetic variety, S_1 recurrent selection.

Horse's tooth disease of maize, caused by the ascomycete *Claviceps gigantea* (Fuentes *et al.*, 1964), sexual phase of the anamorph *Sphacelia* sp., has disseminated from the regions in which it was

con buen comportamiento agronómico y resistencia genética a la enfermedad “diente de caballo”, siguiendo un programa de selección recurrente con líneas S_1 .

Palabras clave: CP-Hilda 2, variedad sintética, selección S_1 recurrente

La enfermedad del diente de caballo, causada por el ascomiceto *Claviceps gigantea* (Fuentes *et al.*, 1964), fase sexual del anamorfo *Sphacelia* sp., se ha diseminado de las regiones donde se reportó inicialmente que se consideran el valle de Toluca en el Estado de México y la sierra de Pátzcuaro, Michoacán, a diferentes localidades en los estados de Puebla e Hidalgo, todas con alta humedad relativa y bajas temperaturas. En todas estas localidades, la enfermedad causa pérdidas en la producción del cereal en donde se siembran semillas de maíces híbridos o variedades locales que son susceptibles a la enfermedad.

La enfermedad se inicia cuando al madurar los granos de maíz infectados por el hongo desarrollan esclerocios, estructuras de reposo que les permite invernar. Durante la cosecha, los esclerocios caen al suelo y permanecen en estado dormante durante el invierno para reactivar su metabolismo en la siguiente temporada de lluvias. Al reactivarse en condiciones favorables de humedad y temperatura, los esclerocios germinan formando estípites (tallos) con cabezuelas en el ápice en las que se forman peritecios que contienen ascas con ascosporas las cuales son las estructuras infectivas del hongo que penetran la mazorca e infectan estigmas frescos. En su fase asexual, los esclerocios también desarrollan micro y macroconidios, los cuales también pueden penetrar en la mazorca e infectar los estigmas frescos (Osada, 1984).

Como parte del manejo integrado de esta enfermedad, se inició el proyecto para generar variedades

originally reported, namely, the Toluca Valley in the State of Mexico and the Pátzcuaro mountains, in Michoacán, to different locations in the states of Puebla and Hidalgo, all of which display high relative humidity and low temperatures. In these locations, the disease causes losses in the production of the cereal where susceptible hybrids or local varieties of maize seeds are planted.

The disease begins when the newly matured maize kernels infected by the fungus develop sclerotia, resting structures that allow them to hibernate. During harvest, the sclerotia fall to the ground and remain dormant during the winter to reactivate their metabolism in the following rainy season. When they reactivate under favorable conditions of humidity and temperature, the sclerotia germinate forming stipes (stalks) with head-like structures in the apex in which perithecia are formed, containing asci with ascospores, the infective structures of the fungus which penetrate the ear and infect fresh silks. In its asexual phase, the sclerotia also produce micro and macroconidia, which may also penetrate the ear and infect the fresh silks (Osada, 1984).

As a part of the integrated management of this disease, the project was started to generate open-pollinated maize synthetic varieties with good agronomic characters and genetic resistance to the disease. Genetic resistance is considered the most efficient and cheapest control for this and other crop diseases (Pandey and Gardner, 1992).

The breeding program for the development of germplasm with desirable agronomic characters and genetic resistance to horse's tooth began in 2009 with the development of a genetically broad-based maize population with yellow endosperm. This base maize population was formed by recombining a total of 55 different maize cultivars collected in the Mexican highlands with good agronomic characters, including commercial hybrids, and improved and native varieties in

de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica de control de ésta y otras enfermedades de cultivos (Pandey y Gardner, 1992).

El programa de mejoramiento para desarrollo de germoplasma con caracteres agronómicos deseables y resistencia genética al diente de caballo se inició en 2009 con el desarrollo de una población de maíz con endospermo amarillo y amplia base genética. Esta población base de maíz se formó recombinando un total de 55 diferentes maíces colectados en el altiplano de México con buen comportamiento agronómico, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas en lotes aislados durante dos ciclos. Los lotes de recombinación se establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, México (19°13'N, 100°07'W, 1870 msnm). Después de dos ciclos de recombinación inicial (C0), se inició un programa de selección S₁ recurrente (Pandey y Gardner, 1992), autofecundando aproximadamente 400 plantas deseables en cada ciclo de mejoramiento y generando semilla S₁ en cada uno de tres ciclos de mejoramiento y generando semilla S₁ en cada ciclo. Semilla de las S₁ obtenidas, se sembraron mazorca por surco en un vivero establecido en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México (19°24'N, 99°41'W, 2667 msnm), donde se presenta la enfermedad en condiciones naturales. Mazorcas de familias S₁ seleccionadas por caracteres agronómicos se inocularon con una suspensión acuosa de 1x10⁵ macrosporas mL⁻¹ del patógeno *Sphacelia* sp. (Figura 1).

Aproximadamente 33% de las líneas S₁ inoculadas y seleccionadas por caracteres agronómicos deseables y resistencia a la enfermedad, se recom-

isolated plots for two cycles. The recombination plots were established in a farmer's field in the *ejido* of Santa Teresa Tiloxtoc, in Valle de Bravo, Mexico (19°13'N, 100°07'W, 1870 masl). After two initial cycles of recombination (C0), an S₁ recurrent selection program began (Pandey and Gardner, 1992), self-pollinating approximately 400 desirable plants in each breeding cycle and generating S₁ seed in each cycle. Seeds from the S₁ obtained were planted ear-to-row, in the field of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) in El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Mexico (19°24'N, 99°41'W, 2667 masl), where the disease is presents under natural conditions. Ears of S₁ families selected for their desirable agronomic characters were inoculated with an aqueous suspension of 1x10⁵ macrospores mL⁻¹ of the pathogen *Sphacelia* sp. (Figure 1).

Approximately 33% of the S₁ lines inoculated and selected by desirable agronomic characters and resistance to the disease were recombined to begin a new cycle of improvement of the base population. This population breeding process is continuous. At the same time, in each evaluation cycle of the S₁ lines, groups of 10-12 lines with specific desirable characters were selected, such as uniformity in days to flower, plant and ear height, earliness, etc. These groups of lines were crossed in a diallelic design to generate the F₁ of new experimental synthetic varieties, which were moved on to F₂ to be included in agronomic trials with other varieties obtained in that or other cycles, along with commercial hybrids, to measure their agronomic performance and grain yield.

In yield trials established with F₂ seed from experimental varieties obtained from lines of the C₃-S₁ cycle, experimental variety Yellow 2 was chosen for its outstanding characters over other entries included in the same trials (Table 1). In 2018, this variety was submitted to the National Seed



**Figura 1. Micro y macroconidios de *Sphacelia* sp., anamorfo de *Claviceps gigantea*.
Figure 1. Micro and macroconidia of *Sphacelia* sp., anamorph of *Claviceps gigantea*.**

binaron para iniciar un nuevo ciclo de mejoramiento de la población base. Este proceso de mejoramiento poblacional es continuo. Simultáneamente, en cada ciclo de evaluación de las líneas S_1 , se seleccionaron grupos de 10-12 líneas con un carácter específico deseable, como son uniformidad en fecha de floración, altura de planta y mazorca, precocidad, etc. Estos grupos de líneas se cruzaron en diseño dialélico para generar la F_1 de nuevas variedades sintéticas experimentales, que se avanzaron a F_2 para ser incluidas en ensayos agronómicos con otras variedades obtenidas en ese u otros ciclos, e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano.

En ensayos de rendimiento establecidos con semilla F_2 de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo C_3 - S_1 , la variedad experimental Amarilla 2 fue seleccionada por sus caracteres sobresalientes sobre otros materiales incluidos en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2018, esta

Inspection and Certification Service (SNICS) for approval as the new CP-Hilda 2 synthetic variety, which was given to the Colegio de Postgraduados, and registered under the breeder's title 2166. Certified seed from this variety is currently in production in farmers fields with good results (Figure 2).

The synthetic maize variety CP-Hilda 2 has yellow grain, it is high-yield, with a potential grain yield of 10 t ha^{-1} , it is genetically resistant to horse's tooth, its seed is low-cost and it can be planted for several years without affecting its grain yield. The impact of this project on society is the increase of farmers income due to the low cost of the seed and the increase in maize productivity due to its good yield and resistance to the disease, which helps to prevent its spreading. The synthetic variety CP-Hilda 2 is registered in the SNICS and belongs to the Colegio de Posgraduados for its distribution and commercialization.

variedad se sometió ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) para aprobación como la nueva variedad CP-Hilda 2, la cual se entregó al Colegio de Postgraduados que fue reconocido con el título de obtentor 2166. Semilla certificada de esta variedad se encuentra en producción en lotes de agricultores con buenos resultados (Figura 2).

La variedad sintética de maíz CP-Hilda 2 es de grano amarillo, de alto rendimiento, con potencial de 10 t ha⁻¹, posee resistencia genética al diente de caballo, su semilla es de bajo costo y se puede sembrar durante varios años sin afectar su rendimiento de grano. El impacto de este proyecto hacia la sociedad, es el incremento de ingreso económico del agricultor debido al bajo costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad, la cual ayuda a evitar la diseminación de esta. La variedad



Figura 2. Lote de producción de semilla certificada de la variedad sintética CP-Hilda 2 en Huejotzingo, Puebla, México, durante el año 2019.

Figure 2. Production plot of certified seeds of the synthetic variety CP-Hilda 2 in Huejotzingo, Puebla, Mexico, in the year 2019.

Cuadro 1. Comportamiento agronómico promedio de la variedad sintética de maíz amarillo CP-Hilda 2 (Toluca, 2017 y 2018) para registro en el SNICS.

Table 1. Average agronomic behavior of the yellow maize synthetic variety CP-Hilda 2 (Toluca, 2017 and 2018) for registration in the SNICS.

| Genealogía | Origen Toluca 13 | ASI ¹ | Índice altura ² | Aspecto planta (1-5) ³ | Aspecto mazorca (1-5) ³ | Rendimiento de grano (t ha ⁻¹) ⁴ |
|------------------|------------------|------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Amarilla 2 | 14 | 1.0 a | 0.45 a | 1.3 a | 1.2 a | 9.1 a |
| Amarilla 1 | 12 | 2.5 a | 0.49 ab | 1.4 ab | 1.1 a | 8.9 a |
| Amarilla 3 | 11 | 2.5 a | 0.49 ab | 2.0 b | 1.4 a | 8.8 a |
| Amarilla 4 | 13 | 2.5 a | 0.48 ab | 1.8 ab | 1.2 a | 8.3 b |
| Testigo (Blanco) | BG1384W | 3.2 a | 0.50 ab | 1.6 ab | 1.2 a | 8.8 a |
| Promedio | | 2.34 | 0.48 | 1.62 | 1.22 | 8.78 |
| DMS (5%) | | 2.6 | 0.03 | .633 | 0.3 | 1.1 |
| CV (%) | | 17.8 | 22.3 | 19.4 | 28.4 | 18.7 |

¹ASI=Anthesis-Silking Interval= Días a floración femenina menos días a floración masculina / ASI=Anthesis-Silking Interval= Days to female flowering minus days to male flowering.

² Índice de altura= Relación entre altura de mazorca y altura de planta / Height index= Ear height: plant height ratio.

³ Aspecto: 1= Muy bueno, 5= muy malo / Aspect: 1= Very good, 5= very poor

⁴ Rendimiento de grano ajustado a 15% de humedad / Grain yield adjusted to 15% humidity.

En cada columna valores seguidos de la misma letra indican no hay diferencia significativa (0.05%) / Values in each column followed by the same letter indicate no significant difference (0.05%)

sintética CP-Hilda 2 está registrada en el SNICS y es propiedad del Colegio de Posgraduados para su distribución y comercialización.

LITERATURA CITADA

- Fuentes SF, de la Isla ML, Ullstrup AJ, and Rodríguez AE. 1964. *Claviceps gigantea* a new pathogen of maize in Mexico. *Phytopathology* 54:379-381.
- Osada SK. 1984. Estudio sobre la germinación del cornezuelo del maíz e interacción hospedante-parásito (*Zea mays* L.-*Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*). Tesis doctoral. Especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 86p.
- Pandey S and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. *Advances in Agronomy* 28:1-87. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60935-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60935-9)