

***Fusarium* sp., causal agent of vascular wilt in citrus and its sensitivity to fungicides**

***Fusarium* sp., agente causal de la marchitez vascular en cítricos y su sensibilidad a fungicidas**

Luis Enrique Ortiz-Martínez, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología¹, Postgrado en Edafología², Colegio de Postgraduados^{1,2}, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, México, CP 56230; **Leticia Robles-Yerena***, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-SENASICA, Km 37.5 Carretera México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, CP 55740; **Santos Gerardo Leyva-Mir**, Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, México, CP 56230; **Moisés Camacho-Tapia**, Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, México, CP 56230; **Lucia Juárez-Rodríguez**². *Corresponding author: leticia.robles.i@senasica.gob.mx

Received: June 28, 2021.

Accepted: December 03, 2021.

Ortiz-Martínez LE, Robles-Yerena L, Leyva-Mir SG, Camacho-Tapia M and Juárez-Rodríguez L. 2022. *Fusarium* sp., causal agent of vascular wilt in citrus and its sensitivity to fungicides. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 1-17.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-3>

First DOI publication: December 21, 2021.

Primera publicación DOI: 21 de Diciembre, 2021.

Abstract. Citrus wilt is a disease of recent appearance in the northern area of Veracruz that causes economic losses to producers in the region. The present work aimed to identify the causative agent of this disease and evaluate different fungicides to determine its *in vitro* sensitivity. A fungus was consistently isolated in plants with wilt symptoms; it was morphologically identified in

Resumen. La marchitez y muerte de los cítricos es una enfermedad de reciente aparición en la zona norte de Veracruz, que ocasiona pérdidas económicas a los productores de la región. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar al agente causal de esta enfermedad y evaluar diferentes fungicidas para determinar su sensibilidad *in vitro*. De manera consistente se aisló un hongo en plantas con síntomas de marchitez, se identificó morfológicamente en diferentes medios de cultivo y molecularmente con los iniciadores EF1-728F/EF1-986R mediante PCR. El hongo se inoculó en tres variedades de cítricos bajo condiciones de invernadero. La prueba de sensibilidad se realizó con los fungicidas clorotalonil, benomil tiabendazol, procloraz y un biológico (*Bacillus subtilis*) a diferentes concentraciones, más un testigo negativo. Se identificó morfológica y molecularmente a *Fusarium* sp. (No. de accesoión MW438335) como agente causal

different culture media and molecularly identified by PCR using the EF1-728F/EF1-986R primers. The fungus was inoculated in three varieties of citrus under greenhouse conditions. The sensitivity test was carried out with the fungicides chlorothalonil, benomyl thiabendazole, prochloraz, and a biological agent (*Bacillus subtilis*) at different concentrations, plus a negative control. *Fusarium* sp. (Accession No. MW438335) was morphologically and molecularly identified as the causal agent of vascular wilt in citrus fruits, causing growth retardation, decreased number of roots, wilting of the apical bud, and necrosis in the vascular system of the three varieties inoculated. The most effective fungicides in inhibiting mycelial growth were thiabendazole, prochloraz, and the biological agent *Bacillus subtilis*.

Key words: Identification, morphology, Koch's postulates, *in vitro* control.

Citrus fruits, especially orange (*Citrus sinensis*), Persian lime (*C. latifolia*), Mexican lemon (*C. aurantifolia*), mandarin (*C. reticulata*), and grapefruit (*C. paradisi*), are the most cultivated and consumed fruits throughout the world (Iqbal *et al.*, 2018). They are considered universal fruit trees because they are present in more than 100 countries and are the most economically important group of fruits, representing 20% of the world fruit market (Franco *et al.*, 2015). Mexico is the fourth largest citrus producer worldwide (FAOSTAT, 2019). Its citrus-producing areas are in tropical and subtropical areas, which causes phytosanitary problems. Among the most important diseases of citrus trees are those caused by bacteria, viruses, viroids, and fungi (Holguín *et al.*, 2012).

In 2018, in Papantla, Veracruz, 'Valencia' orange trees (*Citrus sinensis*) were observed with

de la marchitez vascular de los cítricos, mismo que ocasionó retraso de crecimiento, disminución de cantidad de raíces, marchitez del brote apical y necrosis en el sistema vascular en las tres variedades inoculadas. Los fungicidas con mayor eficacia en inhibir el crecimiento micelial fueron tiabendazol, prochloraz y el biológico *Bacillus subtilis*.

Palabras clave: Identificación, morfología, postulados de Koch, control *in vitro*.

Los cítricos, en especial la naranja (*Citrus sinensis*), lima persa (*C. latifolia*), limón mexicano (*C. aurantifolia*), mandarina (*C. reticulata*) y pomelo (*C. paradisi*), son las frutas más cultivadas y consumidas en todo el mundo (Iqbal *et al.*, 2018). Son considerados frutales universales ya que están presentes en más de 100 países y son el grupo de frutas más importantes económicamente, abarcando un 20% del mercado mundial de frutas (Franco *et al.*, 2015). México es el cuarto productor de cítricos mundialmente (FAOSTAT, 2019); sus áreas cítricas se encuentran en zonas tropicales y subtropicales, lo que propicia problemas fitosanitarios. Dentro de las enfermedades más importantes, están las causadas por bacterias, virus, viroides y hongos (Holguín *et al.*, 2012).

En 2018, en Papantla, Veracruz, se observaron árboles de naranjo 'Valencia' (*Citrus sinensis*) con síntomas de clorosis, defoliación y marchitez de ramas (Figura 1). Esta enfermedad es un problema alarmante para los citricultores por las pérdidas económicas que ocasiona y se desconoce el agente causal.

Las principales enfermedades que inducen la caída de hojas y marchitez en cítricos, en especial aquellas causadas por oomicetes y ascomicetes, son ocasionadas por los siguientes géneros: *Lasioidiplodia* spp., *Phytophthora* spp. y *Fusarium*

symptoms of chlorosis, defoliation, and wilting of branches (Figure 1). This disease poses an alarming problem for citrus growers due to the economic losses it can cause and the fact that the causative agent is still unknown.

The main diseases inducing leaf drop and wilt in citrus trees are caused by the following genera: *Lasiodiplodia* spp., *Phytophthora* spp., and *Fusarium* spp. (Hannachi *et al.*, 2014; Savita and Nagpal, 2012; Valle-De la Paz *et al.*, 2019). The fungi of the genus *Fusarium* belong to the kingdom Fungi, phylum Ascomycota, order Hypocreales. They comprise a great diversity of fungi species that can be saprophytic or pathogenic to plants, animals, and humans (Moretti, 2009). They are filamentous, cosmopolitan, have well-developed septate mycelium and characteristic conidiophores (Villa-Martínez *et al.*, 2014). The *Fusarium* species complex is among the 10 most important fungal

spp. (Hannachi *et al.*, 2014; Savita y Nagpal, 2012; Valle-De la Paz *et al.*, 2019). Los hongos del género *Fusarium* pertenecen al reino fungi, phylum ascomycota y orden hipocreales, comprenden una gran diversidad de especies de hongos que pueden ser saprófitas o patógenas de las plantas, animales y humanos (Moretti, 2009). Son filamentosos, cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos (Villa-Martínez *et al.*, 2014). El complejo de especies de *Fusarium* se encuentra en el top 10 de los principales patógenos fúngicos de plantas (Dean *et al.*, 2012), esto se debe al impacto económico negativo que provoca en la agricultura mundial, ya que son agentes causales del marchitamiento vascular y pudrición basal en una gran variedad de plantas. La pudrición de raíz causada por *Fusarium* spp., es una enfermedad destructiva en el cultivo de cítricos (Yaseen y D'Onghia, 2012). Actualmente, se reportan más



Figure 1. 'Valencia' orange trees (*Citrus sinensis*) with severe wilting and defoliation in Papantla, Veracruz.
Figura 1. Árbol de naranjo 'Valencia' (*Citrus sinensis*) con marchitez y defoliación severa en Papantla, Veracruz.

pathogens of plants (Dean *et al.*, 2012) due to its negative economic impact on world agriculture. These fungi are the causal agents of vascular wilting and basal rot in a wide variety of plants. Root rot caused by *Fusarium* spp. is a destructive disease of citrus crops (Yaseen and D'Onghia, 2012). More than 40 phylogenetic strains of *Fusarium* that affect citrus trees have been reported (Sandoval-Denis *et al.*, 2018). In Mexico, Parra-Cota *et al.* (2018) made the first report of wilt in 'Valencia' orange trees, caused by seven isolates of the *Fusarium solani* species complex in the Yaqui Valley, Sonora. This fungus can associate with other microorganisms and act synergistically with them (Lamichhane and Venturi, 2015). This is why determining the pathogenicity is essential for the identification of microorganisms associated with diseased plants. When the association of an organism with a disease turns out to be constant, it is important to comply with Koch's postulates to confirm its pathogenicity.

Chemical control is the main strategy for the management of fungal diseases (Villa-Martínez *et al.*, 2014). The disinfection of substrates with hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, quaternary ammonium salts, and formaldehyde is the first preventive barrier against *Fusarium inoculum* (Vásquez-Ramírez and Castaño-Zapata, 2017). The application of benzimidazole-based fungicides such as benomyl, carbendazim, thiabendazole, and thiophanate helps reduce rot caused by *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, and *Fusarium solani* (Voigt, 2002). It has also been reported that fungicides based on organomercury and formalin inhibit *Fusarium* spp. growth (Cook, 1981). The application of methyl bromide fumigant was the most common alternative for managing rot diseases until it was withdrawn from the market in 2005. Nowadays, the application of fumigants such as 1,3-dichloropropene, chloropicrin, sodium N-methyl dithiocarbamate,

de 40 cepas filogenéticas de *Fusarium* afectando cítricos (Sandoval-Denis *et al.*, 2018). En México, Parra-Cota *et al.* (2018) realizaron el primer reporte de marchitamiento en naranja 'Valencia' ocasionado por siete aislados del complejo de especies de *Fusarium solani* en el Valle del Yaqui, Sonora. Este hongo puede asociarse con otros microorganismos y actuar de forma sinérgica (Lamichhane y Venturi, 2015), por lo tanto, la determinación de patogenicidad es fundamental en la identificación de los microorganismos asociados a plantas enfermas. Cuando la asociación constante de un organismo con una enfermedad se hace evidente, es importante cumplir con los postulados de Koch para confirmar su patogenicidad.

El control químico es la principal estrategia para el manejo de enfermedades fúngicas (Villa-Martínez *et al.*, 2014). La desinfección de sustratos con peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, sales cuaternarias de amonio y formaldehído, son la primera barrera preventiva para eliminar fuentes de inóculo de *Fusarium* (Vásquez-Ramírez y Castaño-Zapata, 2017). La aplicación de fungicidas a base de benzimidazoles como benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato en las plantas ayuda a reducir las pudriciones causadas por *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* (Voigt, 2002). Asimismo, se ha reportado que los fungicidas a base de organomercurio y formalina son inhibidores de *Fusarium* spp. (Cook, 1981). La utilización de fumigante bromuro de metilo era la práctica más común para el manejo de la enfermedad, hasta que se retiró del mercado en 2005; actualmente, la aplicación de fumigantes, como 1,3-dicloropropeno, cloropicrina, N-metil ditiocarbamato de sodio y metil isotiocianato, son mayormente empleados en presembrado (McGovern, 2015; Vásquez-Ramírez y Castaño-Zapata, 2017). Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación se orientó a identificar morfológica y

and methyl isothiocyanate, is mostly used in pre-planting (McGovern, 2015; Vásquez-Ramírez and Castaño-Zapata, 2017). The present study aimed to morphologically and molecularly identify the causal agent of citrus wilt in the municipality of Papantla, Veracruz, to check if Koch's postulates were fulfilled in three citrus varieties under greenhouse conditions, and to evaluate the *in vitro* sensitivity of the pathogen to different fungicides.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in the Laboratory of Agricultural Parasitology of the Universidad Autónoma de Chapingo, Mexico.

Isolation and purification. Roots and stems of eight diseased 'Valencia' orange trees were collected in four farms located in the San Pablo ejido, in the municipality of Papantla, in the state of Veracruz, Mexico. The site is located at 20° 27' N and 97° 11' W, at 45 meters above sea level. Pieces of 1 cm in length were cut in the laboratory and disinfected in sodium hypochlorite solution (1%) for one minute, rinsed twice with sterile water, and dried with sterile paper towels. Under aseptic conditions, six pieces of tissue from each sample were placed in each Petri dish containing Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium (200 g potato, 15 g dextrose, 20 g agar in 1000 mL of distilled water), and were then incubated at room temperature for 24 h, under a 12 h light/12 h dark cycle. To obtain pure isolates, a mycelium fragment was transferred into water agar culture medium. After 24 h, small pieces of culture medium containing hyphal tips were transferred into individual Petri dishes with PDA medium.

Morphological characterization. Three standard culture media, Leslie and Summerell's (2006),

molecularmente al agente causal de la marchitez de los cítricos en el municipio de Papantla, Veracruz; realizar los postulados de Koch en tres variedades bajo condiciones de invernadero y evaluar la sensibilidad *in vitro* del patógeno a diferentes fungicidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, México.

Aislamiento y purificación. Se colectaron raíces y tallos de ocho árboles enfermos de naranja 'Valencia' en cuatro fincas ubicadas en el ejido San Pablo, municipio de Papantla, Veracruz, México; en las coordenadas 20° 27' latitud N y 97° 11' longitud W, a 45 msnm. En laboratorio, se cortaron trozos de 1 cm de longitud y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, se enjuagaron dos veces con agua estéril y se secaron con toallas de papel estériles. En condiciones asépticas, se colocaron seis trozos de tejido por muestra en cada caja Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (200 g papa, 15 g dextrosa, 20 g agar en 1000 mL de agua destilada) y se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, bajo un régimen de 12 h luz / 12 h de oscuridad. Para la obtención de aislados puros, se transfirió un fragmento de micelio en el medio de cultivo Agua agar, y después de 24 h se tomaron pequeños trozos de medio que contenían puntas de hifas y se transfirieron en cajas Petri individuales con medio PDA.

Caracterización morfológica. Para identificar la especie de estudio, se usaron tres medios de cultivo estándares establecidos por Leslie y Summerell (2006), Carnation Leaf-piece Agar (CLA), Spezieller

Carnation Leaf-piece Agar (CLA), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), and PDA were used to identify the species under study. Semi-permanent preparations were made of eight isolates of the fungus and glycerin (50%), with five replicates per isolate. The structures were examined using a compound microscope (Nikon SMZ800®, USA) with an integrated digital camera. The 40x objective was used to take photographs, which were analyzed with the program Motic Imagen v. 3.0 (Motic Group, 2018) to perform the qualitative (shape) and quantitative (length x width) characterization of 50 macroconidia, 50 microconidia, and 20 chlamydospores per preparation. The eight fungal isolates presented the same morphological characteristics. Consequently, it was decided to work with a single isolate for further analysis.

Pathogenicity test. To determine the infective potential of the fungal isolate in citrus trees, three 14-month-old plants of different varieties were inoculated: ‘Valencia’ orange ‘Volkameriana’ rootstock (T4), ‘Delicias’ mandarin ‘Sour’ rootstock (T5), and ‘Valencia’ orange ‘Sour’ rootstock (T6), with their respective negative controls T1, T2, T3, with three repetitions each, in a completely randomized experimental design. Once the greenhouse experiment was set up, the plant roots were inoculated by immersion (Güler and Güldür, 2018; Herman and Perl-Treves, 2007). All the plants were removed from the substrate trying to do the least damage possible. The roots were washed with common water before inducing slight wounds in them with the help of scissors to create entrance routes for the *Fusarium* isolate. Subsequently, the roots were placed in a suspension of conidia (1×10^6 spores mL⁻¹) for 24 h. Negative controls were subjected to the same treatment but their roots were immersed in sterile water. The plants were placed individually in pots containing sterile Peat Moss

Nährstoffarmer Agar (SNA) y PDA. Se hicieron preparaciones semipermanentes con glicerina al 50% de ocho aislados del hongo y cinco repeticiones por aislado. Las estructuras se examinaron en un microscopio compuesto (Nikon SMZ800®, EE. UU.) con cámara digital integrada, usando el objetivo de 40x para tomar fotografías, las cuales se analizaron con el programa Motic Imagen v. 3.0 (Motic Group, 2018) para realizar la caracterización cualitativa (forma) y cuantitativa (largo por ancho) de 50 macroconidios, 50 microconidios y 20 clamidosporas por preparación. Los ocho aislados fúngicos presentaron las mismas características morfológicas, en consecuencia, se decidió trabajar con un solo aislado para posteriores estudios.

Prueba de patogenicidad. Para determinar el potencial infectivo del aislado fúngico en cítricos, se inocularon en tres variedades de 14 meses de edad: naranja ‘Valencia’ portainjerto ‘Volkameriano’ (T4), mandarina ‘Delicias’ portainjerto ‘Agrio’ (T5) y naranja ‘Valencia’ portainjerto ‘Agrio’ (T6), con sus respectivos controles negativos T1, T2, T3, con tres repeticiones cada uno, en un diseño experimental completamente al azar. Una vez montado el ensayo en invernadero, se procedió a realizar la inoculación por inmersión de raíces (Güler y Güldür, 2018; Herman y Perl-Treves, 2007): se extrajeron todas las plantas del sustrato tratando de hacer el menor daño posible; con agua común se lavaron las raíces, se indujeron heridas leves en las raíces con la ayuda de tijeras para crear la vía de ingreso del aislado de *Fusarium*, posteriormente las raíces de las plantas se colocaron por 24 h en una suspensión de conidios (1×10^6 esporas mL⁻¹). Los controles negativos se sometieron al mismo método, pero sus raíces se sumergieron en agua estéril. Las plantas se colocaron individualmente en macetas con Peat Moss estéril (PRO-MIX FLEX), se mantuvieron en invernadero con una temperatura diurna y

(PRO-MIX FLEX) and kept in a greenhouse with a day and night temperature of 39 ± 2 °C and 15 ± 2 °C, respectively, and relative humidity of 40-83%. The growth of the vegetative shoots and the height of the plants were recorded on days 1, 15, 60, and 110 after inoculation. At 110 days after inoculation, the microorganisms were purified and described to check if they corresponded to the isolate of *Fusarium* sp. previously inoculated, and to confirm their pathogenicity. The isolation of the fungus in the plant tissue was carried out by direct seeding in PDA culture medium, according to the method proposed by Leslie and Summerell (2006), to comply with Koch's postulates.

***In vitro* fungicide sensitivity test.** Five fungicides were evaluated at different concentrations: Chlorothalonil (1, 5, 10, 100 and 300 mg L⁻¹), Benomyl (1, 5, 10 and 100 mg L⁻¹), Thiabendazole (0.1, 1, 5, 10 mg L⁻¹), *Bacillus subtilis* (0.005, 0.05, 0.1 and 1 mg L⁻¹), and Prochloraz (1, 5 and 10 mg L⁻¹), plus a negative control that consisted of PDA medium without fungicide. Each treatment consisted of three replications in a completely randomized experimental design. To evaluate the efficacy of the fungicides, 5-day-old mycelium discs of 5 mm in diameter were seeded in the center of Petri dishes containing PDA culture medium mixed with the aqueous solution of the corresponding fungicide. All the seeded Petri dishes were labeled, sealed, and incubated at room temperature (26 ± 1 °C) under continuous darkness. The diameter of the mycelial growth was measured every 48 h until the negative control covered the Petri dish completely. The percentage of inhibition was calculated using Abbott's formula: (Control-Treatment)/Control x 100 (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

DNA extraction, PCR, and sequencing. DNA extraction was performed using the Plant DNeasy

nocturna de 39 ± 2 °C y 15 ± 2 °C, respectivamente y humedad relativa del 40 – 83%. El crecimiento de los brotes vegetativos y la altura de la planta se registraron los días 1, 15, 60 y 110 días después de la inoculación. A los 110 días, se realizó la, purificación y descripción del microorganismo, para comprobar si éste correspondía al aislado de *Fusarium* sp. previamente inoculado y confirmar su patogenicidad. El aislamiento del hongo en el tejido vegetal se realizó por siembra directa en medio de cultivo PDA, según la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006), para cumplir con los postulados de Koch.

Prueba de sensibilidad a fungicidas *in vitro*. Se evaluaron cinco fungicidas a diferentes concentraciones: Clorotalonil (1, 5, 10, 100 y 300 mg L⁻¹), Benomil (1, 5, 10 y 100 mg L⁻¹), Tiabendazol (0.1, 1, 5, 10 mg L⁻¹), *Bacillus subtilis* (0.005, 0.05, 0.1 y 1 mg L⁻¹) y Procloraz (1, 5 y 10 mg L⁻¹), más un testigo negativo que consistió en medio PDA sin fungicida. Cada tratamiento consistió en tres repeticiones y se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para evaluar la eficacia de los fungicidas, se sembraron discos de 5 mm de diámetro de micelio con cinco días de edad en el centro de las cajas Petri con medio de cultivo PDA mezclado con la solución acuosa del fungicida correspondiente. Todas las cajas sembradas se etiquetaron, sellaron e incubaron a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) en oscuridad continua, el diámetro del crecimiento micelial se midió cada 48 h, hasta que el testigo negativo cubrió totalmente la caja Petri. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio se calculó con la fórmula de Abbot: (Testigo-Tratamiento)/Testigo x 100 (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación. La extracción de ADN se realizó con el kit Plant DNeasy

Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The PCR was carried out using primers EF1-728F/EF1-986R to amplify a 320-base pair (bp) fragment (Carbone and Kohn, 1999). The reaction mixture was prepared in a final volume of 50 μ L with PCR IX buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.8 μ M of each oligo, 0.04 U DNA polymerase (Promega, USA), and 4 ng of DNA. The PCR was performed in a C1000 thermal cycler (Bio-Rad, USA). An initial denaturation was carried out at 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 54 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 10 min. The amplified products were verified by agarose gel (1%) electrophoresis. The gel was visualized under ultraviolet light using an M-26X transilluminator and a GelDoc-It™ 300 imaging system (UVP, USA). The amplified fragments were purified using the DNA Clean & concentrator-5™ protocol (Zymo Research, USA). The purified DNA fragments were sent to Macrogen® for sequencing.

Phylogenetic tree. To confirm the identity of the pathogen, the sense and antisense sequences were aligned using the software MEGA X 10.0.5 (Kumar *et al.*, 2018). The consensus sequence obtained was compared with those registered in the Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). To construct the phylogenetic tree and identify the clade where the consensus sequence is grouped (*Fusarium* sp. Isolated Veracruz), the sequences of the translation elongation factor 1 alpha (TEF-1 α) of the species complex comprising *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, and *F. citricola*, which affect citrus plants, were downloaded from GenBank (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen and D'Onghia, 2012), as well as the sequences that were most similar to those of the species under study (Table 1). The species

Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la PCR se utilizaron los iniciadores EF1-728F/EF1-986R, que amplifican un fragmento de 320 pares de bases (pb) (Carbone y Kohn, 1999) y la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 μ L, buffer de PCR IX, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.8 μ M de cada oligo, 0.04 U DNA polimerasa (Promega, EE.UU.) y 4 ng de ADN. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C-1000 (Bio-Rad, EE.UU.), se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 54 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se analizó con luz ultravioleta con un transiluminador M-26X usando un sistema de imágenes GelDoc-It™ 300 (UVP, EE.UU.). Los fragmentos amplificados se purificaron mediante el protocolo de DNA clean & concentrator™-5 (Zymo Research, EE. UU.). Dichos fragmentos de ADN purificados se mandaron a secuenciar a la empresa Macrogen®.

Árbol filogenético. Para confirmar la identidad del patógeno, se realizó el ensamble de las secuencias sentido y antisentido con el software MEGA X 10.0.5 (Kumar *et al.*, 2018). La secuencia consenso obtenida se comparó con aquellas registradas en el Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para realizar el árbol filogenético e identificar el clado donde se agrupa la secuencia consenso (*Fusarium* sp. aislado Veracruz), se descargaron del GenBank las secuencias del factor de elongación de traducción 1 alfa (TEF-1 α) del complejo de especies de *Fusarium solani*, *F. oxysporum* y *F. citricola* que afectan al cultivo de cítricos (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen y D'Onghia, 2012), así como las secuencias que tuvieron mayor similitud con la especie en estudio

Table 1. Sequences of *Fusarium* isolates obtained from GenBank and used in the phylogenetic tree (Sandoval-Denis *et al.*, 2018).
Cuadro 1. Secuencias de aislados de *Fusarium* obtenidas de GenBank y utilizadas en el árbol filogenético (Sandoval-Denis *et al.*, 2018).

Species	Strain	Host	GenBank
			Access Number TEF-1 α
<i>F. solani</i>	CPC 28189	<i>Citrus sinensis</i>	LT746226
<i>F. solani</i>	CPC 27193	<i>C. sinensis</i>	LT746222
<i>F. solani</i>	CPC 27198	<i>C. sinensis</i>	LT746223
<i>F. solani</i>	CPC 27192	<i>C. sinensis</i>	LT746221
<i>F. macrosporium</i>		<i>C. sinensis</i>	LT746218
<i>F. croci</i>		<i>C. sinensis</i>	LT746216
<i>F. oxysporum</i>	CPC 28190	<i>C. sinensis</i>	LT746206
<i>F. oxysporum</i>	CPC 27700	<i>C. sinensis</i>	LT746203
<i>F. oxysporum</i>	CPC 27196	<i>C. sinensis</i>	LT746202
<i>F. oxysporum</i>	CPC 27194	<i>C. sinensis</i>	LT746201
<i>F. citricola</i>	CPC 27813	<i>C. reticulata</i>	LT746198
<i>F. citricola</i>	CPC 27709	<i>C. sinensis</i>	LT746196
<i>F. citricola</i>	CPC 27069	<i>C. sinensis</i>	LT746195
<i>F. citricola</i>	CPC 27067	<i>C. limon</i>	LT746194
<i>F. polyphialidicum</i>		<i>Vanilla planifolia</i>	GQ425229
<i>F. concolor</i>			KY794889

Colletotrichum truncatum (KM818513) was used as an external group. Multiple sequence alignment was performed using MUSCLE. The phylogenetic tree was constructed by the Maximum Likelihood (ML) method with 1500 bootstrap repetitions, based on the two-parameter Kimura model and the gamma distribution. The model used was obtained using the model test function in the MEGA X software.

Experimental design and statistical analysis.

The data obtained was subjected to an analysis of variance for the variables of plant height and percentage of inhibition of mycelial growth. Tukey's test for multiple comparisons of means ($P \leq 0.05$) was used for variables with significant effect. The statistical de analysis was carried out using the statistical package SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

(Cuadro 1). Se utilizó como grupo externo a la especie *Colletotrichum truncatum* (KM818513). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con MUSCLE. El árbol filogenético se obtuvo mediante el método de *Maximum Likelihood* (ML) con 1500 repeticiones de bootstrap, basado en el modelo de Kimura de dos parámetros y distribución gamma. El modelo utilizado se obtuvo mediante una prueba de modelos con el software MEGA X.

Diseño experimental y análisis estadístico.

A partir de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza para las variables de altura de la planta y porcentaje de inhibición en el crecimiento mical con el diseño experimental completamente al azar, así como una comparación múltiple de medias Tukey ($P \leq 0.05$) para variables cuyo efecto fue significativo, en el cual se usó el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological identification. Eight isolates were obtained. They presented a circular border, white and orange mycelium with a diameter of 2.6 cm after three days of growth in PDA medium. Macroconidia with two to three septa were observed in CLA medium, with the dorsal side more curved than the ventral side and measuring $16\text{--}30 \times 3\text{--}6 \mu\text{m}$. The microconidia presented zero or one septum, oval in shape, $9\text{--}17 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$ in size. In CLA medium, chlamydospores measured $6\text{--}10 \times 6\text{--}10 \mu\text{m}$, and pale yellow sporodochia were formed (Figure 2). According to the molecular and

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica. Se aislaron ocho aislados, los cuales presentaron un borde circular, micelio de color blanco y anaranjado, con un diámetro de 2.6 cm de tres días de crecimiento en medio PDA. En medio CLA se observaron macroconidios con dos a tres septos, con el lado dorsal más curvo que el ventral y midieron de $16\text{--}30 \times 3\text{--}6 \mu\text{m}$. Los microconidios presentaron entre cero y un septo, de forma oval, de $9\text{--}17 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$. En medio CLA, las clamidosporas midieron $6\text{--}10 \times 6\text{--}10 \mu\text{m}$ y se formaron esporodocios de color amarillo pálido (Figura 2). De acuerdo con las características

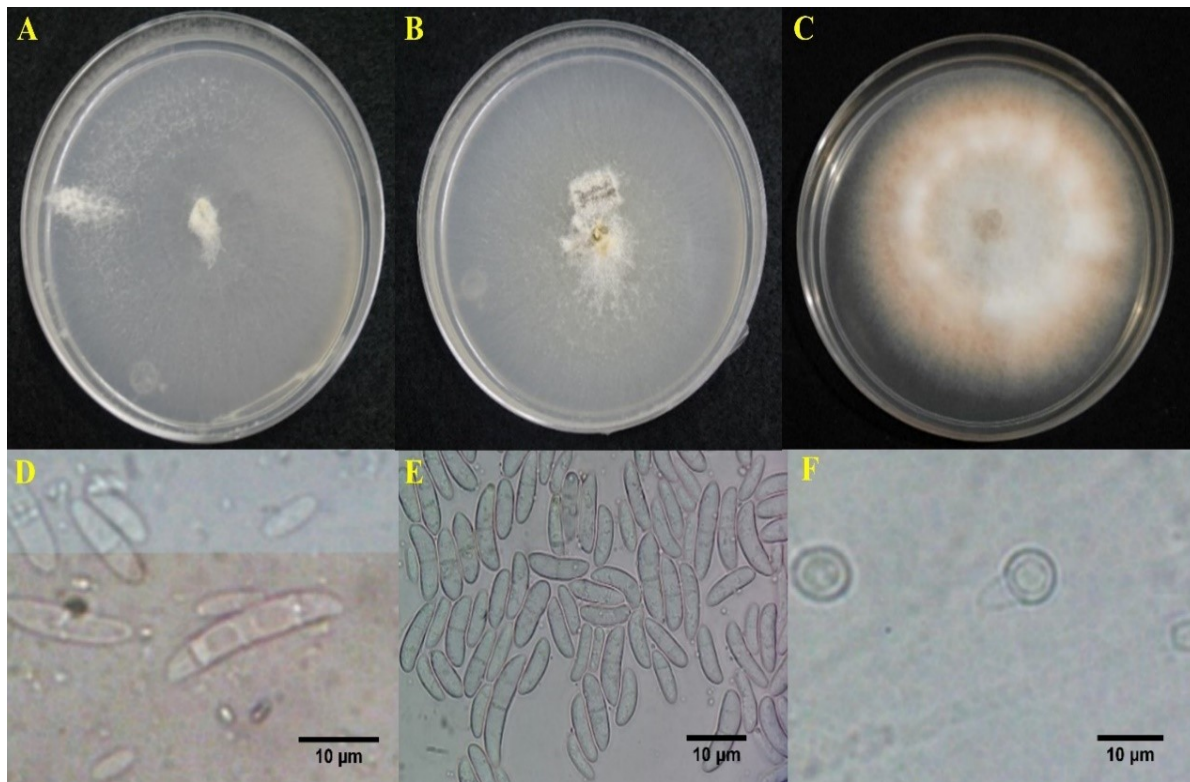


Figure 2. *Fusarium* sp. isolated from 'Valencia' orange tree (*Citrus sinensis*). A) Growth of *Fusarium* sp. in SNA medium; B) in CLA medium; C) in PDA; D) macroconidia; E) microconidia; F) chlamydospores.

Figura 2. *Fusarium* sp. aislado de naranjo 'Valencia' (*Citrus sinensis*). A) Crecimiento de *Fusarium* sp., en medio SNA, B) en medio CLA, C) en PDA, D) macroconidios, E) microconidios y F) clamidosporas.

morphological characteristics observed here, the eight isolates correspond to the genus *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006). The fungal isolates presented the same morphological characteristics. Consequently, it was decided to work with a single isolate in subsequent studies.

Pathogenicity test. Ten days after inoculation, all plants that were in contact with the spore suspension exhibited wilt symptoms on vegetative shoots. Sandoval-Denis *et al.* (2018) reported that *Fusarium sarcochroum* causes regressive death in lemon and mandarin branches in Italy and Spain. In the present study, the inoculated plants showed little growth of the root system and a brown or dark reddish-brown coloration in the vascular bundle. This partially agrees with what was reported by Hannachi *et al.* (2015), who observed a reduction in growth and a limited number of roots in citrus plants inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri*, three weeks after inoculation. The fungus was isolated from root tissue with vascular necrosis, fulfilling Koch's postulates (Figure 3).

The non-inoculated treatments of 'Valencia' orange 'Volkameriana' rootstock (T1), 'Delicias' mandarin 'Sour' rootstock (T2), and 'Valencia' orange 'Sour' rootstock (T3), had a height of 103 to 112 cm 110 days after inoculation, while the inoculated treatments (T4, T5, and T6) were between 85 and 93 cm in height. This meant a 16.9-17.4% reduction in height compared with the non-inoculated treatments (Figure 4). These results indicate that the pathogen can affect the growth of citrus plants, which agrees with the results reported by Baysal-Gurel and Cinar (2015) on grapefruit trees infected with *F. oxysporum*, which showed reduced vigor and foliage chlorosis.

Fungicide sensitivity test. The analysis of variance showed significant differences between the treatments. The treatments that inhibited

culturales y morfológicas aquí observadas, los ocho aislados corresponden al género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Asimismo, los aislados fúngicos presentaron las mismas características morfológicas, en consecuencia, se decidió trabajar con un solo aislado para posteriores estudios.

Prueba de patogenicidad. Diez días después de la inoculación, todas las plantas que estuvieron en contacto con la suspensión de esporas exhibieron síntomas de marchitez en los brotes vegetativos. Sandoval-Denis *et al.* (2018) reportaron que *Fusarium sarcochroum* causa muerte regresiva en ramas de limón y mandarina, en Italia y España. Por otra parte, las plantas inoculadas presentaron escaso crecimiento en el sistema radical y en el haz vascular se observó una coloración marrón o café rojizo oscuro. Lo cual concuerda parcialmente con lo reportado por Hannachi *et al.* (2015) quienes observaron una reducción de crecimiento y número limitado de raíces en plantas de cítricos inoculados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri*, tres semanas después de la inoculación. A partir de tejido de raíz con necrosis vascular, se logró aislar el hongo y cumplir con los postulados de Koch (Figura 3).

Los tratamientos no inoculados de naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano' (T1), mandarina 'Delicias' portainjerto 'Agrio' (T2) y naranja 'Valencia' portainjerto 'Agrio' (T3), tuvieron una altura de 103 a 112 cm a los 110 días después de la inoculación, mientras que los tratamientos inoculados (T4, T5 y T6) presentaron una altura entre 85 y 93 cm, esto significó una reducción del 16.9 al 17.4% de la altura respecto a los tratamientos no inoculados (Figura 4). De acuerdo con los resultados, se concluyó que el patógeno tiene la capacidad de afectar el crecimiento de los cítricos. Lo cual concuerda con lo reportado por Baysal-Gurel y Cinar (2015) para árboles de pomelo infectados con *F. oxysporum*, los cuales mostraron un reducido vigor y clorosis en el follaje.

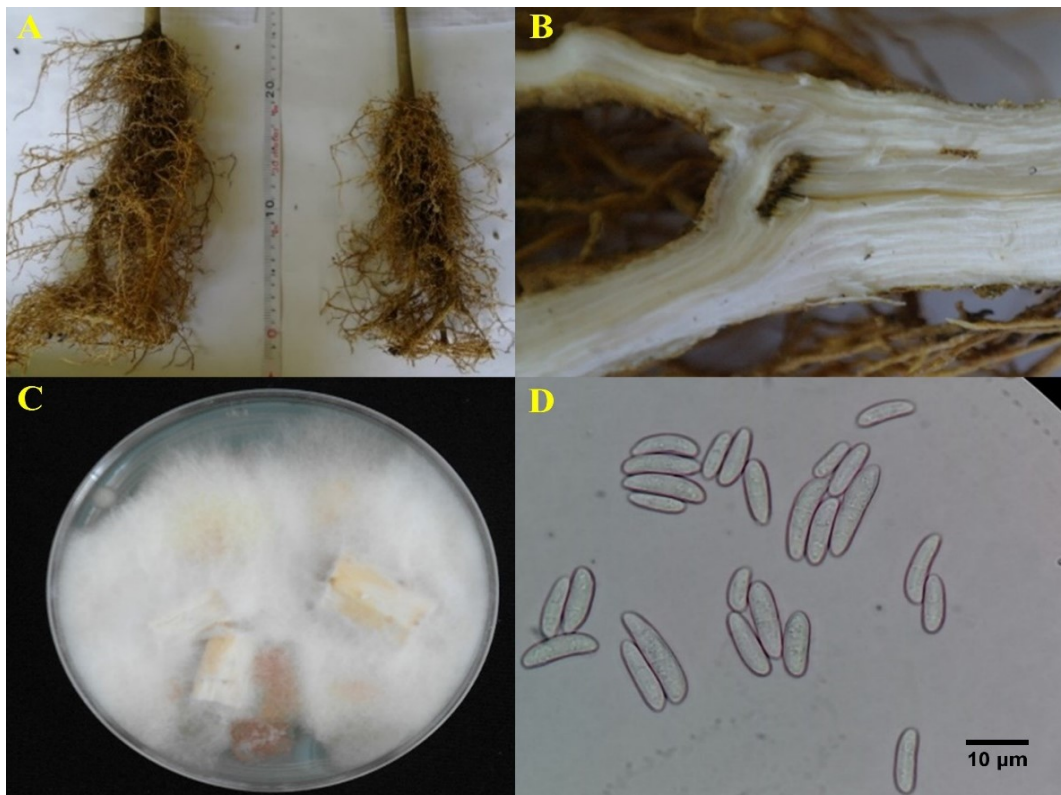


Figure 3. A) Root system of non-inoculated 'Valencia' 'Volkameriana' rootstock plants (left) vs 'Valencia' orange 'Volkameriana' rootstock inoculated with *Fusarium* sp. (right); B) necrosis in the vascular system of the inoculated plant; C) recovery of the inoculated isolate in citrus plants; D) microconidia of the recovered isolate.

Figura 3. A) Sistema radical de plantas de naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano' no inoculado (izquierda) vs naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano' inoculado con *Fusarium* sp. (derecha), B) necrosis en el sistema vascular en la planta inoculada, C) recuperación del aislado inoculado en cítricos y D) microconidios del aislado recuperado.

mycelial growth were thiabendazole, *B. subtilis*, and prochloraz (Table 2). Thiabendazole inhibited 100% of mycelial growth starting at a concentration of 5 mg L⁻¹. These results are similar to those reported by Yossen and Conles (2014), who reported that thiabendazole had 99.8% efficacy in the control of *F. oxysporum* at 4 mg L⁻¹ under *in vitro* conditions. *B. subtilis* presented 100% inhibition from 1 mg L⁻¹ and Romero-Velázquez *et al.* (2015) found that *B. subtilis* inhibited 100% of the growth of *F. oxysporum* starting at a concentration of 0.01 mg L⁻¹. The difference in the sensitivity to *B. subtilis* between the present study

Prueba de sensibilidad a fungicidas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en los tratamientos. Los tratamientos que inhibieron el crecimiento micelial fueron, tiabendazol, *B. subtilis* y procloraz (Cuadro 2). Tiabendazol inhibió 100% del crecimiento micelial a partir de 5 mg L⁻¹. Lo cual es similar a lo reportado por Yossen y Conles (2014) quienes detectaron con tiabendazol un 99.8% de eficacia en el control de *F. oxysporum* a 4 mg L⁻¹ en condiciones *in vitro*. *B. subtilis* presentó 100% de inhibición a partir de 1 mg L⁻¹ y Romero-Velázquez *et al.* (2015) encontraron que *B. subtilis* inhibió 100% a *F. oxysporum* a partir de 0.01 mg

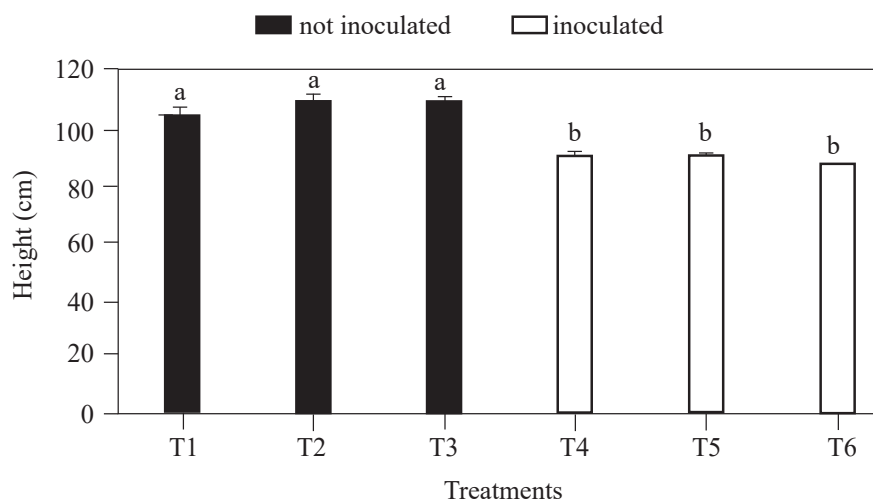


Figure 4. Height of citrus plants inoculated with *Fusarium* sp. 110 days after inoculation. T1, T4: 'Valencia' orange 'Volkameriana' rootstock; T2, T5: 'Delicias' mandarin 'Sour' rootstock; T3, T6: 'Valencia' orange 'Sour' rootstock. Means with different letters are statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 4. Altura de las plantas de cítricos inoculados con *Fusarium* sp., a los 110 días después de la inoculación. T1, T4: naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano'; T2, T5: mandarina 'Delicias' portainjerto 'Agrio'; T3, T6: naranja 'Valencia' portainjerto 'Agrio'. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Table 2. Percentage of inhibition of the mycelial growth of *Fusarium* sp. treated with fungicides and *B. subtilis*.
Cuadro 2. Porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. tratado con fungicidas y *B. subtilis*.

Concentration (mg L ⁻¹)	Control	Chlorothalonil	Benomyl	Thiabendazole	<i>B. subtilis</i>	Prochloraz
	0.0 h ^x					
0.005					81.0 bc	
0.05					82.3 bc	
0.1				0.0 h	80.6 bc	
1		24.3 g	10.0 h	33.3 gf	100.0 a	75.3 dc
5		36.6 gf	73.0 dce	100.0 a		84.6 bc
10		40.6 f	74.0 dce	100.0 a		92.3 ba
100		61.3 e	85.3 bc			
300		62.0 de				
DMSH ^y	13.6					
CV ^z (%)	6.7					
Media	64.8					

^xMeans with different letters are statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$). ^yDMSH: honest minimum significant difference; ^zCV: coefficient of variation. / ^xMedias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). ^yDMSH: diferencia mínima significativa honesta; ^zCV: coeficiente de variación.

and the study of Romero-Velázquez *et al.* (2015) may be due to the different strains of *B. subtilis* used in each study. It is possible that the fungi belong to different *Fusarium* species or that the isolates used in the present study are resistant to *B. subtilis* (Bardin *et al.*, 2015). Further studies are required to corroborate these assumptions.

Similar studies have found that *B. subtilis* isolates produce substances such as ammonia and indole acetic acid (IAA), which inhibit the mycelial growth of *F. oxysporum* (Mohammed *et al.*, 2019; Sharifi and Ramezani, 2003). Prochloraz inhibited 92% of mycelial growth starting at a concentration of 10 mg L⁻¹. These results agree with those reported by Song *et al.* (2004), who found that the most effective fungicides for inhibiting the mycelial growth of *F. oxysporum* were prochloraz and carbendazim. Similar results showed that prochloraz inhibited 100% of the growth of *F. oxysporum* under *in vitro* conditions at a concentration of 100-1000 mg L⁻¹ (Romero-Velázquez *et al.*, 2015). Amini and Sidovich (2010) demonstrated that under field conditions the application of 10 mg L⁻¹ of bromuconazole and prochloraz completely reduced the severity of the disease caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causative agent of vascular wilt in tomato.

Molecular identification and phylogenetic tree.

BLASTN searches using partial TEF1 sequences from the pathogenic isolate showed 98.7% similarity to *F. polyphialidicum* (accession No. GQ425229). The phylogenetic tree yielded four highly contrasting lineages, three of which corresponded to the species complex formed by *F. oxysporum*, *F. citricola*, and *F. solani*, currently known as citrus pathogens (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen and D'Onghia, 2012). The fourth lineage grouped *Fusarium* sp. isolated Veracruz, *F. polyphialidicum*, and *Fusarium* cf. *concolor* (Figure 5).

L⁻¹. La diferencia encontrada en la sensibilidad a *B. subtilis* en este estudio y la reportada por Romero-Velázquez *et al.* (2015), puede deberse a las cepas de *B. subtilis* utilizadas en los estudios, los hongos pertenecen a diferentes especies de *Fusarium* o el aislado de esta investigación puede presentar resistencia a *B. subtilis* (Bardin *et al.*, 2015), aunque es preciso realizar más estudios para corroborar dichos supuestos.

Estudios similares han encontrado que los aislados de *B. subtilis* producen sustancias como el amoníaco y ácido indol acético (IAA) que inhiben el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (Mohammed *et al.*, 2019; Sharifi y Ramezani, 2003). Prochloraz inhibió 92% del crecimiento micelial a partir de 10 mg L⁻¹. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Song *et al.* (2004), donde encontraron que los fungicidas más efectivos para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* fueron prochloraz y carbendazim. Resultados similares mostraron que prochloraz inhibió 100% a *F. oxysporum* en condiciones *in vitro* a una concentración de 100 - 1000 mg L⁻¹ (Romero-Velázquez *et al.*, 2015). Mientras que, en condiciones de campo, Amini y Sidovich (2010) demostraron que la aplicación de 10 mg L⁻¹ de bromuconazole y prochloraz, redujeron completamente la severidad ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal de la marchitez vascular en jitomate.

Identificación molecular y árbol filogenético.

Búsquedas en BLASTN usando secuencias parciales TEF1 del aislado patogénico, generó 98.7% de similitud con *F. polyphialidicum* (No. de acceso GQ425229). El árbol filogenético arrojó cuatro linajes altamente contrastantes, de los cuales, tres correspondieron al complejo especies de *F. oxysporum*, *F. citricola* y *F. solani*, actualmente conocidos como agentes patógenos de cítricos (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen y D'Onghia, 2012). Mientras que el cuarto linaje

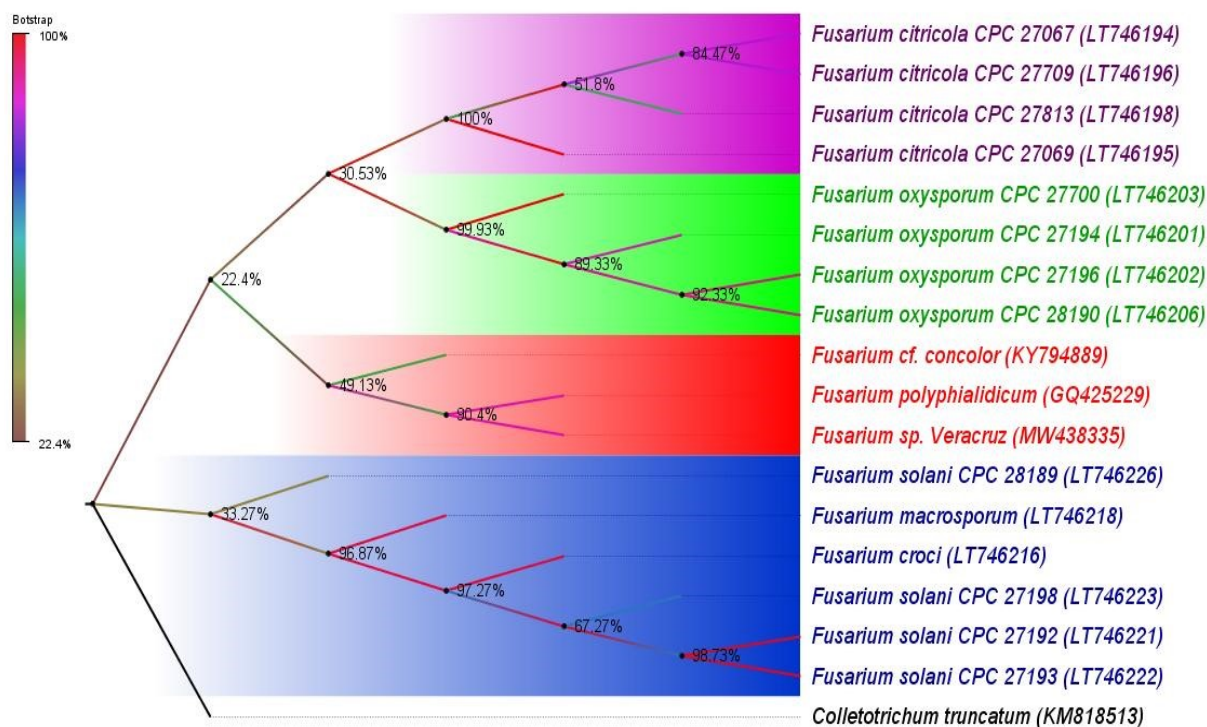


Figure 5. Phylogenetic tree based on the comparison of the sequences of the TEF-1 α of *Fusarium* species. *Maximum Likelihood* (ML) with 1500 bootstrap repeats, based on the two-parameter Kimura model and the gamma distribution. The isolate under study is *Fusarium* sp., isolated in Veracruz. The accession numbers of the sequences registered in the NCBI database are indicated in parentheses.

Figura 5. Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias del TEF-1 α de especies de *Fusarium*. *Maximum Likelihood* (ML) con 1500 repeticiones de bootstrap, basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros y distribución gamma. El aislado de estudio es *Fusarium* sp. aislado Veracruz. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias registradas en la base de datos del NCBI.

CONCLUSIONS

The morphological characterization, molecular identification, and pathogenicity tests confirm that *Fusarium* sp., and possibly *F. polyphialidicum*, is the causal agent of vascular wilt in citrus plants from Papantla, Veracruz. The symptoms presented by infected citrus trees were apical bud wilting, growth retardation, decreased number of roots, and necrosis of the vascular system. All three varieties of citrus plants were affected by the pathogen. The fungicides with the highest efficacy in inhibiting mycelial growth were thiabendazole (100%), *B.*

agrupó a *Fusarium* sp. aislado Veracruz, *F. polyphialidicum* y *Fusarium cf. concolor* (Figura 5).

CONCLUSIONES

De acuerdo con la caracterización morfológica, la identificación molecular y las pruebas de patogenicidad, se confirma a *Fusarium* sp., posiblemente *F. polyphialidicum* como agente causal de la marchitez vascular de los cítricos en Papantla, Veracruz. Los síntomas que presentaron los árboles de cítricos infectados fue marchitez de brote apical, retraso de

subtilis (100%) and prochloraz (92%) under *in vitro* conditions.

LITERATURE CITED

- Amini J and Sidovich DF. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* 50:172-178. <http://www.plantprotection.pl/The-effects-of-fungicides-on-Fusarium-oxysporum-f-sp-lycopersici-associated-with,91523,0,2.html>
- Bardin M, Ajouz S, Comby M, Lopez-Ferber M, Graillot B, Siegwart M and Nicot PC. 2015. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science* 6: 566. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566>
- Baysal-Gurel F and Cinar A. 2015. First report of *Fusarium* root rot caused by *Fusarium oxysporum* infecting pigmented grapefruit trees in Turkey. *Plant Disease* 99: 553. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0746-PDN>
- Carbone I and Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3):553-556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Cook RJ. 1981. *Fusarium* diseases in the People's Republic of China. Pp:53-55. In: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy* (eds PE Nelson TA Toussoun y RJ Cook). University Park, Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press.
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- FAOSTAT. 2019. Food and agriculture data. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (consulta, diciembre 2020).
- Franco VA, Castillo LS, García OJ y Rodríguez NE. 2015. Situación de la citricultura en el Estado de Nuevo León. Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. <https://docplayer.es/28330442-Situacion-de-la-citricultura-en-nuevo-leon-cdanl-%20corporacion-para-el-desarrollo-agropecuario-gobierno-del-estado-de-nuevo-leon.html> (consulta, noviembre 2020).
- Güney IG and Güldür ME. 2018. Inoculation techniques for assessing pathogenicity of *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* on pepper seedlings. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 5(1): 1-8. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/402109>
- Hannachi I, Poli A, Rezgui S, Prasad RD and Cherif M. 2015. Genetic and phenotypic differences of *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri* isolated from sweet orange and tangerine. *European Journal of Plant Pathology* 142: 269-280. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0611-1>
- crecimiento, disminución de cantidad de raíces y necrosis del sistema vascular. Las tres variedades de cítricos fueron afectadas por el patógeno. Los fungicidas con mayor eficacia para inhibir el crecimiento micelial fueron tiabendazol (100%), *B. subtilis* (100%) y prochloraz (92%) bajo condiciones *in vitro*.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Hannachi I, Rezgui S and Cherif M. 2014. First report of mature citrus trees being affected by *Fusarium* wilt in Tunisia. *Plant Disease* 98: 566. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1134-PDN>
- Herman R and Perl-Treves R. 2007. Characterization and inheritance of a new source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1.2 in *Cucumis melo*. *Plant Disease* 91:1180-1186. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1180>
- Holguín PRJ, Hernandez MLG y Zulueta RR. 2012. El huanglongbing: la tristeza de los cítricos. *La ciencia y el hombre* 25:3. <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num3/articulos/huanglongbing/>
- Iqbal Z, Khan MA, Sharif M, Shah JH, ur Rehman MH and Javed K. 2018. An automated detection and classification of citrus plant diseases using image processing techniques: a review. *Computers and Electronics in Agriculture* 153: 12-32. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.07.032>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lamichhane JR and Venturi V. 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science*. 6:385. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Leslie JF and Summerell B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Manhattan, USA. 388p. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Liu HF, Zhou J, Liao J, Yi JP, Ma DF and Deng JX. 2020. Grafted twig rot on *Citrus sinensis* caused by a member of the *Fusarium solani* species complex. *Canadian Journal of Plant Pathology* 42: 133-139. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1633412>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73:78-92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Miranda-Granados J, Chacón C, Ruiz-Lau N, Vargas-Díaz ME, Zepeda LG, Álvarez-Gutiérrez P, Meza-Gordillo R and Lagunas-Rivera S. 2018. Alternative use of extracts

- of chipilín leaves (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) as antimicrobial. Sustainability 10: 883. <https://doi.org/10.3390/su10030883>
- Mohammed BL, Hussein RA and Toama FN. 2019. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. Energy Procedia 157:171-179. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.178>
- Moretti A. 2009. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. Matica Serbian Journal for Natural Sciences 117:7-13. <https://doi.org/10.2298/zmspn0917007m>
- Motic Group. 2018. Motic images plus for windows 64 bit. Release 3.0. Motic Group. Hong Kong, China. <https://moticeurope.com/en/news-and-events/post/motic-images-plus-3-0-user-manual.html>
- Parra-Cota FI, García-Pereyra J, Aviña-Martínez GN, y 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. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-3>
- Romero-Velázquez SD, Tlalpan-Bolaños B, Cadena-Iñiguez J, Nieto-Ángel D, y Arévalo-Galarza ML. 2015. Hongos causantes de enfermedades postcosecha en chayote (*Sechium edule* (Jacq.) SW.) y su control *in vitro*. Agronomía Costarricense 39:19-32. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/436/43642603002/43642603002.pdf>
- Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G and Crous PW. 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. Persoonia 40:125. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.01>
- SAS Institute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. North Carolina, USA.
- Savita GVS and Nagpal A. 2012. Citrus diseases caused by *Phytophthora* species. GERF Bulletin of Biosciences 3:18-27. https://www.academia.edu/5763877/Citrus_diseases_caused_by_Phytophthora_species
- Sharifi TA and Ramezani M. 2003. Biological control of *Fusarium oxysporum*, the causal agent of onion wilt by antagonistic bacteria. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 68:543-547. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15151288/>
- Song W, Zhou L, Yang C, Cao X, Zhang L and Liu X. 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Protection 23:243-247. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.007>
- Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Gijón-Hernández AR, Alía-Tejagal I, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández V, Hernández-Arenas M y Ariza-Flores F. 2019. Especies de *Lasiodiplodia* en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) en Morelos, México. Revista Bio Ciencias 6: e595. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e595>
- Vásquez-Ramírez LM and Castaño-Zapata J. 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica 20:363-374. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262017000200014
- Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales HA, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra JM y Martínez-Escudero E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agronómica 64:194-205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Voigt K. 2002. Management of *Fusarium* Diseases. Pp:217-242. In: Kempken F (eds.). Agricultural Applications. Vol. 11. Springer. Berlin, Germany. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2_388p
- Yaseen T and D'Onghia AM. 2012. *Fusarium* spp. associated to citrus dry root rot: an emerging issue for mediterranean citriculture. Acta Horticulturae 940:647-655. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.940.89>
- Yossen VE y Conles MY. 2014. Eficacia de fungicidas *in vitro* para el control de *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*, agentes causales de marchitamiento en el cultivo de orégano en la Argentina. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán 91:19-25. https://nanopdf.com/download/eficacia-de-fungicidas-in-vitro-para-el-control-de-fusarium_pdf