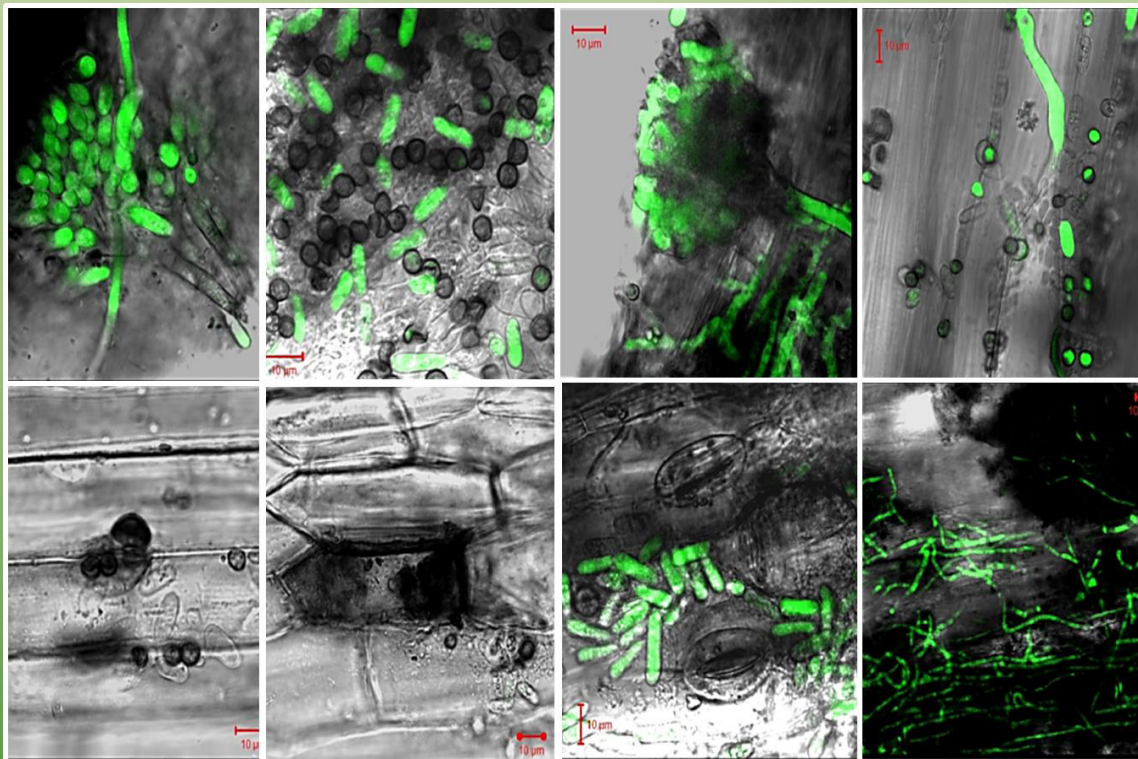


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 40, NÚMERO 2, Mayo 2022



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

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Editora Técnica * Technical Editor

Dra. Norma Ávila Alistac, UACH

Composición Web y RMFito * Web and RMFito Composition

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, COLPOS

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

Editoras Adjuntas * Senior Editors

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Vicente Febres, UF, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Rodrigo Valverde, LSU AgCenter, USA

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

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Liliana Aguilar Marcelino, INIFAP

Dra. Mirella Romero Bastidas, UABCS

Dra. Sylvia P. Fernández Pavía, UMSNH

M.C. Coral Mendoza Ramos, LANREF-CP

Dra. Evangelina E. Quiñones Aguilar, CIATEJ

Dr. Alejandro Tovar Soto, IPN

Dr. Mauricio Luna Rodríguez, UV

Dr. Emiliano Loeza Kuk, INIFAP

Dr. José Luciano Morales, UMSNH

Dr. Ángel Ramírez Suárez, SENASICA

Dr. Daniel Ruiz Juárez, UAM-X

Dr. Jairo Cristóbal Alejo, ITConkal

Dr. Gabriel Rincón Enriquez, CIATEJ

Dr. Rodolfo Velásquez Valle, INIFAP

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, CIAD

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Luis Antonio Mariscal Amaro, INIFAP

Dr. Alejandro C. Michel Aceves, CSAEGro.

Dr. José Antonio Mora Aguilera, COLPOS

Dr. Luis Fernando Ceja Torres, CIIDIR, IPN

Portada: Formación de estructuras reproductivas de las cepas 1088 (superior) y R 256 (*Colletotrichum lindemuthianum*) (inferior) en dos variedades de frijol Bat 93 (cuadrantes izquierda) y Victoria (cuadrantes derecha). Recuadros inferiores izquierda reacción incompatible con cepa R 256 en variedad Bat 93.

Original: Simpson J, Avila de Dios E, Gómez VAD, Pérez-López AV, Castro MA, Meléndez BY, Hernández SL, Gálvez SL, López RME, Medina CR and Gil-Vega KDC.
Página: 267.

SCIENTIFIC ARTICLES * ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- Biochemical characterization of oxidative stress in the compatible interaction between *Pepper golden mosaic virus* and habanero pepper plants** * Caracterización bioquímica del estrés oxidativo durante la interacción compatible entre el *Pepper golden mosaic virus* y plantas de chile habanero. 145
Aguilar-Sánchez C, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C and Moreno-Valenzuela OA.
- Phytochemical profile and *in vitro* activity of *Agave angustifolia* and *A. cupreata* extracts against phytopathogenic fungi** * Perfil fitoquímico y actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Agave angustifolia* y *A. cupreata* contra hongos fitopatógenos. 169
Almazán-Morales A, Moreno-Godínez ME, Hernández-Castro E, Vázquez-Villamar M, Mora-Aguilera JA, Cabrera-Huerta E and Alvarez-Fitz P.
- Epidemiology of *Bean common mosaic virus* and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes** * Epidemiología de *Bean common mosaic virus* y *Alternaria alternata* en 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*. 188
Gonzalez-Cruces A, Arista-Carmona E, Díaz-Arias KV, Ramírez-Razo K, Hernández-Livera A, Acevedo-Sánchez G, Mendoza-Ramos C and Mora-Aguilera G.

PHYTOPATHOLOGICAL NOTES * NOTAS FITOPATOLÓGICAS

- Resistance evaluation of oat genotypes to stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*)** * Evaluación de la resistencia de genotipos de avena a roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*). 221
Huerta-Espino J, Ramírez-Ramírez EE, Leyva-Mir SG, Villaseñor-Mir HE, Santa-Rosa RH, Martínez-Cruz E and Rodríguez-García MF.
- Potential biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp. TSO2 against *Bipolaris sorokiniana*, spot blotch in wheat** * Mecanismos potenciales de biocontrol de *Bacillus* sp. TSO2 contra *Bipolaris sorokiniana*, mancha borrosa del trigo. 230
Valenzuela-Ruiz V, Parra-Cota FI, Santoyo G and de los Santos-Villalobos S.
- Disinfectants effectiveness in *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) transmission in tobacco plants** * Efectividad de desinfectantes en la transmisión del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en plantas de tabaco. 240
Rodríguez-Díaz CI, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL and González-Garza R.

- In vitro* nematocidal activity of the *Pleurotus djamor* PdR-2 fraction against J2 of *Meloidogyne enterolobii*** * Actividad nematocida *in vitro* de la fracción PdR-2 de *Pleurotus djamor* contra J2 *Meloidogyne enterolobii*. 254
Gómez-Rodríguez O, Pineda-Alegría JA, Castañeda-Ramírez GS, González-Cortazar M, Sánchez JE and Aguilar-Marcelino L.
- Omics applications in plant-microorganism interactions: A view from plant genomics** 263
* Aplicaciones Ómicas en la interacción Planta-Microorganismos: Una visión desde la genómica vegetal.
Simpson J, Avila de Dios E, Gómez VAD, Pérez-López AV, Castro MA, Meléndez BY, Hernández SL, Gálvez SL, López RME, Medina CR and Gil-Vega KDC.
- Potassium silicate as a fungicide enhancer against *Botrytis cinerea* in blackberry** * 270
Silicato de potasio como potencializador de fungicidas contra *Botrytis cinerea* en zarzamora.
Nieto-Angel D, Terrones-Salgado J, Ortega-Acosta SA, Ortega-Acosta C, Téliz-Ortiz D, Sánchez-Ruiz FJ, Vallejo-Pérez MR, Palemón-Alberto F and Ortega-Martínez LD.
- Parasitic behavior of *Nacobbus aberrans* populations from different geographical origin in tomato plants** * Habilidad parasítica de poblaciones de *Nacobbus aberrans* de diferente origen geográfico en plantas de jitomate. 284
Palacios-Alcántara M, Marban-Mendoza N, Carrillo-Fonseca CL, Acuña-Soto JA and Cabrera-Hidalgo ADJ.
- PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS * REPORTES FITOPATOLÓGICOS**
- First report of *Clonostachys rosea* associated with avocado fruit rot in Puebla, Mexico** 298
* Primer reporte de *Clonostachys rosea* asociado a la pudrición del fruto de aguacate en Puebla, México.
Coyotl-Pérez WA, Romero-Arenas O, Mosso-González C, Pacheco-Hernández Y, Rivera-Tapia JA and Villa-Ruano N.

Biochemical characterization of oxidative stress in the compatible interaction between *Pepper golden mosaic virus* and habanero pepper plants

Caracterización bioquímica del estrés oxidativo durante la interacción compatible entre el *Pepper golden mosaic virus* y plantas de chile habanero

Cristina Aguilar-Sánchez, División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera estatal libre Villahermosa Comalcalco Km 27 S/N, Ranchería, Jalpa de Méndez, Tabasco, C.P. 86205; **Yereni Minero-García**, ¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 # 130, Chuburna de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México, C.P. 97205; **Cecilia Hernández-Zepeda**, Unidad de Ciencias del Agua, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 8, No. 39, Mz. 29, S.M. 64 Cancún, Quintana Roo, México, C.P. 77500; **Oscar Alberto Moreno-Valenzuela***.

*Corresponding autor: oamv@cicy.mx

Received: November 15, 2021.

Accepted: March 13, 2022.

Aguilar-Sánchez C, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C and Moreno-Valenzuela OA. 2022. Biochemical characterization of oxidative stress in the compatible interaction between *Pepper golden mosaic virus* and habanero pepper plants. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 145-168.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2111-1>

Primera publicación DOI: 29 de Marzo, 2022.

First DOI publication: March 29, 2022.

Abstract. In this work, the role of *Pepper golden mosaic virus*-mosaic strain (PepGMV-Mo) infection on hydrogen peroxide (H₂O₂), salicylic acid (SA), and the antioxidant enzymes catalase (CAT) and peroxidase (POX) were analyzed *in vitro* during the compatible interaction between

Resumen. En este trabajo, se realizó el análisis *in vitro* del papel de la infección por la cepa del *Pepper golden mosaic virus*-mosaico (PepGMV-Mo) en los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido salicílico (SA, por su término en inglés) y de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y peroxidasa (POX), durante la interacción compatible entre el PeGMV-Mo y *Capsicum chinense*. Los niveles endógenos de H₂O₂, SA, CAT y POX fueron monitoreados en un experimento curso temporal y los niveles de las cuatro variables incrementaron en las plantas inoculadas con PepGMV-Mo en comparación con el control de infección simulada (vector de clonación sin virus o infección simulada, mock) y con plantas sanas. Se observaron tres picos de incremento del H₂O₂ en las plantas inoculadas durante el curso temporal. El primer incremento se observó al inicio de la línea del

PepGMV-Mo and *Capsicum chinense* plants. Endogenous H_2O_2 , SA, CAT and POX were monitored over time, and the levels of all four were increased in the PepGMV-Mo-Mo inoculated plants compared to the mock-inoculated (cloning vector) and healthy plants. Three peaks of H_2O_2 were observed in the inoculated plants during the time course experiment. The first increase was observed at the beginning of the time course experiment, at 30 minutes post inoculation (mpi), and the last at the end of the experiment, at 24 days post inoculation (dpi). The SA concentration increased 12 hours post-inoculation (hpi) in inoculated plants relative to mock-inoculated and healthy plants. Due to PepGMV-Mo infection, CAT and POX activity increased. An increase in CAT activity was observed 4 hpi in PepGMV-Mo-infected plants, and a decrease in CAT activity correlated with the increase in SA concentration at 12 hpi in the infected plants. POX activity was higher in the infected plants than in the mock-inoculated and healthy plants for the duration of the time course experiment. Taken together, the findings suggest that oxidative stress is involved in the compatible interaction between PepGMV-Mo-Mo and *C. chinense*; however, this burst was not sufficient to confer resistance or tolerance to habanero pepper against the virus based on symptom phenotype observed.

Key words: *in vitro* plants, hydrogen peroxide, salicylic acid, peroxidase, catalase.

The geminivirus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), is a bipartite single stranded virus transmitted by whiteflies and it considered a major pathogen that infects numerous solanaceous crops, including different species of *Capsicum* in Mexico and Central America (Barboza *et al.*, 2018;

tiempo, a 30 minutos después de la inoculación (mdi) y el último pico se observó al final del experimento, a 24 días después de la inoculación (ddi). Las concentraciones del SA incrementaron a las 12 horas después de la inoculación (hdi) en las plantas inoculadas con el virus en comparación con las plantas control y las plantas sanas. La concentración de SA incrementó a las 12 horas después de la inoculación (dpi) en las plantas inoculadas con el PepGMV-Mo en comparación a las plantas control y plantas sanas. Debido a la infección con el PepGMV-Mo, la actividad de CAT y POX incrementó. Se observó un incremento en la actividad de CAT a las 4 hdi en las plantas infectadas con PepGMV-Mo y un decremento en la actividad de CAT correlacionada con el incremento en la concentración de SA a las 12 hpi en las plantas infectadas. La actividad de POX fue mayor en las plantas infectadas que en las plantas control y las plantas sanas durante el curso temporal. En conjunto, los resultados sugieren que el estrés oxidativo está involucrado en la interacción compatible entre el PepGMV-Mo y *C. chinense*; sin embargo, esta explosión oxidativa no fue suficiente para conferir resistencia o tolerancia contra el virus con base en el fenotipo observado en plantas de chile habanero.

Palabras clave: plantas *in vitro*, peróxido de hidrógeno, ácido salicílico, peroxidasa, catalasa.

El geminivirus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) es un virus bipartita monocatenario transmitido por la mosquita blanca y es considerado un patógeno importante que infecta a varios cultivos de solanáceas, incluyendo a diferentes especies de *Capsicum* en México y Centroamérica (Barboza *et al.*, 2018; Hernández-Espinal *et al.*, 2018; Méndez-Lozano *et al.*, 2001; Nakhla *et al.*, 2005). Con base en sus propiedades genómicas y

Hernández-Espinal *et al.*, 2018; Méndez-Lozano *et al.*, 2001; Nakhla *et al.*, 2005). Based on their genomic and biological properties, three strains of PepGMV are reported as PepGMV-Serrano (PepGMV-Se), PepGMV-Mosaic (PepGMV-Mo) and PepGMV-Distortion (PepGMV-Di) and they cause different symptoms in the infected plants. PepGMV-Se causes a bright golden mosaic, PepGMV-Mo produced a yellow-green mosaic, and PepGMV-Di caused only a mild mosaic and foliar distortion followed by a “recovery” phenotype (Brown *et al.*, 2005), that has been associated with posttranscriptional and transcriptional gene silencing (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). A geminivirus genetic resistance trait was characterized in the *Capsicum chinense* BG-3821 accession, and the marker genes for systemic acquired resistance (SAR) were found to be induced after inoculation of resistant leaves with PepGMV (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011). These findings suggest that resistance in plants depends at least in part on the early response to virus infections, such as the induction of genes related to H₂O₂ production.

Plants respond to pathogen attacks by activating both local and systemic defenses that restrict the growth and spread of the pathogen. In infected leaves, these defenses often involve the hypersensitive response (HR) and the formation of necrotic lesions at the infection site (Lukan *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2007). Eventually, the non-inoculated parts of the plant develop a long-lasting SAR (Clark *et al.*, 2007). One of the earliest events in the HR is a burst of oxidative metabolism leading to the generation of superoxide anion radicals (O²⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) (Wohlgemuth *et al.*, 2002). Hydrogen peroxide is an important signal molecule in plant defense against biotic and abiotic stress (Quan *et al.*, 2008; Mejía-Teniente *et al.*, 2019). Plants have developed antioxidant

biológicas, se reportaron tres cepas del PepGMV: PepGMV-Serrano (PepGMV-Se), PepGMV-Mosaico (PepGMV-Mo) y PepGMV-Distorsión (PepGMV-Di), que causan síntomas diferentes en las plantas infectadas. PepGMV-Se causó un mosaico dorado brillante, PepGMV-Mo produjo un mosaico amarillo verdoso y PepGMV-Di causó únicamente un leve mosaico y distorsión foliar, seguido de un fenotipo de “recuperación” (Brown *et al.*, 2005), que ha sido relacionado con el silenciamiento de genes postranscripcionales y transcripcionales (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). En la accesión *Capsicum chinense* BG-3821 se caracterizó un rasgo de resistencia genética geminiviral y se encontró que los genes marcadores para la resistencia sistémica adquirida (RSA) se indujeron después de la inoculación de hojas de plantas resistentes con el PepGMV (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011). Estos resultados sugieren que la resistencia en plantas depende, al menos en parte, de la respuesta temprana a infecciones por virus, tal como la inducción de genes relacionados con la producción de H₂O₂.

Las plantas responden a ataques de patógenos mediante la activación de las defensas locales y de las sistémicas, que restringen el crecimiento y la propagación del patógeno. En hojas infectadas, estas defensas suelen involucrar la respuesta hipersensible (RH) y la formación de lesiones necróticas en el sitio de infección (Lukan *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2007). Con el tiempo, las partes no inoculadas de la planta desarrollan una RSA duradera (Clark *et al.*, 2007). Uno de los primeros eventos en la RH es una explosión del metabolismo oxidativo que conduce a la generación de radicales de anión de superóxido (O²⁻) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Wohlgemuth *et al.*, 2002). El peróxido de hidrógeno es una importante molécula señal en la defensa de la planta contra el estrés biótico y abiótico (Quan *et al.*, 2008; Mejía-Teniente *et al.*, 2019).

mechanisms for protection against the damage caused by Reactive Oxygen Species (ROS). The major ROS scavenging enzymes in plants include CAT and POX. In potato tubers infected with *Erwinia chrysanthemi*, for example, a two-fold increase in CAT activity was observed in infected potato tubers compared to mock-inoculated tubers (Miguel *et al.*, 2000). In another study in which susceptible and resistant tomato cultivars were infected with *Ralstonia solanacearum*, the activities of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and catalase all increased; however, the antioxidative mechanism was found to be much stronger in the resistant cultivars (Mandal *et al.*, 2011). In tomato plants, the inoculation of saprobic fungi filtrates increased enzyme activity of CAT, POX and other antioxidant enzymes. These increases were efficient to control the severity of the early blight disease caused by *Alternaria solani* in tomato plants (Rodrigues-Alencar *et al.*, 2020). Plants generally respond to viral infection with ROS generation and an upregulation of antioxidant enzymes. In the compatible interactions of *Cucumber mosaic virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* with *Cucumis sativus* and *Cucurbita pepo* plants, respectively, increased antioxidant activities of CAT, POX, and superoxide dismutase have been reported. Thus, antioxidant enzymes contribute to oxidative stress in systemic plant-virus interactions (Riedle-Bauer, 2000).

Salicylic acid (SA) is a key signal in plant defense against viral infection and it is considered critical for the activation of both local and systemic resistance responses (Klessig *et al.*, 2018). Findings reported in the literature indicate an H_2O_2 -SA interaction in which H_2O_2 and SA constitute a self-amplifying system: H_2O_2 induces SA accumulation, and SA enhances H_2O_2 levels (Van Camp *et al.*, 1998). Salicylic acid participates

Las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes para la protección contra el daño causado por las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por sus términos en inglés). Las principales enzimas depuradoras de ROS en plantas incluyen CAT y POX. En tubérculos de papa infectados con *Erwinia chrysanthemi*, por ejemplo, se observó que se duplicó la actividad de CAT en tubérculos de papa infectados, en comparación con tubérculos con inoculación simulada (Miguel *et al.*, 2000). En otro estudio, en el que cultivares de tomate susceptibles y resistentes fueron infectados con *Ralstonia solanacearum*, aumentaron las actividades de la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa. Sin embargo, el mecanismo antioxidante demostró ser mucho más fuerte en los cultivares resistentes (Mandal *et al.*, 2011). En plantas de tomate, la inoculación de filtrados de hongos saprobios aumentó la actividad enzimática de CAT, POX y otras enzimas antioxidantes. Estos aumentos fueron eficientes en el control de la severidad del tizón temprano causado por *Alternaria solani* en plantas de tomate (Rodrigues-Alencar *et al.*, 2020). Por lo general, las plantas responden a una infección viral con la generación de ROS y una sobrerregulación de enzimas antioxidantes. En las interacciones compatibles del *Cucumber mosaic virus* y del *Zucchini yellow mosaic virus* con plantas de *Cucumis sativus* y *Cucurbita pepo*, respectivamente, se reportaron aumentos en las actividades antioxidantes de CAT, POX y superóxido dismutasa. De esta forma, las enzimas antioxidantes contribuyen al estrés oxidativo en las interacciones sistémicas planta-virus (Riedle-Bauer, 2000).

El ácido salicílico (SA por su término en inglés) es una señal clave en la defensa de la planta contra infecciones virales y es considerado fundamental para la activación de las respuestas de resistencia, tanto locales como sistémicas (Klessig *et al.*, 2018). Los hallazgos reportados en la literatura

in the induction of the incompatible interaction between plants and virus. After this induction, plant responses with several mechanisms to limit viral propagation at the infection site. These mechanisms include the increase in the production of ROS, pathogenesis-related proteins, induction of the HR, etc. (Baebler *et al.*, 2014). SA is also responsible for the activation of systemic acquired resistance (SAR) in distal tissues, which lessens the effects of secondary attacks. Salicylic acid can induce resistance to *Tobacco mosaic virus* (TMV) by affecting its ability to replicate in the inoculated tissue of *Nicotiana benthamiana* (Chivasa *et al.*, 1997). It is also involved in the inhibition of long-distance movement when *Arabidopsis thaliana* is infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV). Nevertheless, different host species may use distinct approaches for resisting infection by the same virus (Mayers *et al.*, 2005). The aim of the present study was to investigate the role of hydrogen peroxide, salicylic acid and antioxidant enzymes during the compatible interaction between PepGMV-Mo strain and habanero pepper (*Capsicum chinense*) grown *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and treatments

Habanero pepper (*Capsicum chinense*) seeds were germinated *in vitro* using basal MS media. The seeds were disinfected with sodium hypochlorite (2%) and 70% ethanol, washed three times with distilled sterile water then incubated at 50 °C for 30 min to eliminate any seed-borne pathogens. The *in vitro* plants were maintained in a room under controlled environmental conditions (25 to 26 °C, 16:8 h (light/dark) photoperiod, light intensity of 50.26 mmol m⁻² s⁻¹).

indican una interacción H₂O₂-SA en la que el H₂O₂ y SA constituyen un sistema autoamplificante: el H₂O₂ induce la acumulación de SA y el SA aumenta los niveles de H₂O₂ (Van Camp *et al.*, 1998). El SA participa en la inducción de la interacción incompatible entre plantas y virus. Después de esta inducción, la planta responde con varios mecanismos para limitar la propagación viral en el sitio de infección. Dichos mecanismos incluyen el aumento en la producción de ROS, proteínas relacionadas con la patogénesis, la inducción de RH, etc. (Baebler *et al.*, 2014). El SA también es responsable de la activación de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en tejidos distales, que reduce los efectos de ataques secundarios. El SA puede inducir la resistencia al *Tobacco mosaic virus* (TMV) al afectar su habilidad de replicarse en el tejido inoculado de *Nicotiana benthamiana* (Chivasa *et al.*, 1997). También está involucrado en la inhibición de movimiento de larga distancia al infectarse *Arabidopsis thaliana* con el *Cucumber mosaic virus* (CMV). Sin embargo, diferentes especies hospedantes pueden resistir infecciones del mismo virus de formas muy distintas (Mayers *et al.*, 2005). El objetivo del presente estudio fue investigar el papel del peróxido de hidrógeno, el ácido salicílico y enzimas antioxidantes durante la interacción compatible entre la cepa PepGMV-Mo y el chile habanero (*Capsicum chinense*) cultivado *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales vegetales y tratamientos

Se germinaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) *in vitro* usando un medio basal MS. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (2%) y 70% etanol, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se incubaron a 50 °C por

Plant inoculation with PepGMV-Mo

Infective clones of PepGMV-Mo (DNA A and DNAB), donated by Dr. Rafael Rivera-Bustamante, were used to inoculate habanero pepper seedlings using a previously described biolistic inoculation procedure (Idris *et al.*, 2001). The third or fourth leaves of plants at the four-leaf stage of *in vitro* plants were directly bombarded at 900 psi He with gold particles (1 µg, BioRad, Hercules, CA) covered with viral DNA as previously described (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a). For mock inoculation, the plants were bombarded with the cloning vector (Bluescript) without the virus genome. Healthy plants without inoculation were used as control. Inoculations using this protocol were done in four separate experiments, each consisting of six inoculated plants for each time point of the time course experiment, for virus-infected, mock and healthy plants.

Plant material and DNA analysis

Plant material was collected from systemic infected tissue at the following time points: 0 and 30 min; 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h; and 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 days). The samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total DNA was extracted for each treatment as previously described (Echevarría-Machado *et al.*, 2005).

A 576 bp fragment was amplified using the primers prAV324 and prAC889 (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a). PCR was performed using RedTaq Polymerase (Bioline) as described in Hernández-Zepeda *et al.* (2007b). The PCR products were cloned into the pGEMT-Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions, and the cloned inserts were sequenced by MacroGen Inc. The sequences were edited and aligned using EditSeq

30 min para eliminar posibles patógenos presentes en las semillas. Las plantas *in vitro* se mantuvieron en un cuarto bajo condiciones ambientales controladas (25 a 26 °C, fotoperiodo 16:8 h (luz/oscuridad), intensidad de luz de 50.26 mmol m⁻² s⁻¹).

Inoculación de plantas con el PepGMV-Mo

Clonas infecciosas del PepGMV-Mo (ADN A y ADN B), donados por el Dr. Rafael Rivera-Bustamante, fueron usados para inocular plántulas de chile habanero con un procedimiento de inoculación por biolística descrito anteriormente (Idris *et al.*, 2001). Las terceras o cuartas hojas de plantas *in vitro* en la etapa de cuatro hojas fueron bombardeadas de manera directa a 900 psi He con partículas de oro (1 µg, BioRad, Hercules, CA) cubiertas con ADN viral como ya se describió (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a). Para la inoculación simulada, las plantas fueron bombardeadas con el vector de clonación (Bluescript) sin el genoma del virus. Como control se usaron plantas sanas sin inocular. Se realizaron cuatro experimentos separados, cada uno de los cuales consistieron en seis plantas inoculadas para cada punto del curso temporal del experimento, para plantas infectadas con el virus, simuladas y sanas.

Análisis de material vegetal y de ADN

Se recolectó material vegetal de tejido infectado sistémico tras cumplirse los siguientes tiempos: 0 y 30 min; 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h; y 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 días). Las muestras se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El ADN total fue extraído para cada tratamiento como ya se describió (Echevarría-Machado *et al.*, 2005).

Se amplificó un fragmento de 576 bp usando los iniciadores prAV324 y prAC889 (Hernández-

and MegAlign (DNASar version 5.08, Madison, USA) and subjected to a BLASTx search using the NCBI GenBank database.

Southern blot

Five micrograms of total DNA from each treatment were digested with *Hind*III and loaded onto a 1% agarose gel. After electrophoresis, the DNA was transferred to a Hybond N+ membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) by capillary action using a 20X solution of 0.15 M sodium chloride and 0.015 M sodium citrate (SSC). After this, the membrane was UV-crosslinked. The hybridization was performed with 500 ng of the A genome of PepGMV-Mo as probe. The probe was labeled using AlkPhos Direct™ (Alkphos Direct Hybridization kit, Amersham, Arlington Heights, Illinois, USA).

Hydrogen peroxide determination

A modified version of the ferrous ammonium sulfate/xylene orange (FOX) method was used to determine the H₂O₂ contents of the leaf extracts, as previously reported (Cheeseman, 2006). The assay mixture after addition of the sample contained 250 mM ferrous ammonium sulfate, 100 mM sorbitol, 90% ethanol and 100 mM xylene orange in 25 mM sulfuric acid in a total volume of 3 mL. The assay measured the difference in absorbance between 550 and 800 nm for at least 15 min, and the color was stable for at least 1 h. The standard was prepared by dilution in 30% H₂O₂ (reagent grade, SIGMA). The concentration of H₂O₂ in the reagent was calibrated using the absorbance at 240 nm and an extinction coefficient of 43.6 M⁻¹ cm⁻¹.

Salicylic acid determination

Salicylic acid was extracted from leaf tissue (0.3 g) and analyzed as described by Gaffney *et al.*

Zepeda *et al.*, 2007a). Se realizó la PCR usando Polimerasa RedTaq (Bioline) según lo descrito por Hernández-Zepeda *et al.* (2007b). Los productos de la PCR fueron clonados en el Vector pGEMT-Easy (Promega, Madison, WI, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante y los insertos clonados fueron secuenciados por MacroGen Inc. Las secuencias fueron editadas y alineadas usando EditSeq y MegAlign (DNASar versión 5.08, Madison, EE. UU.) y se les realizó una búsqueda de BLASTx usando la base de datos del NCBI GenBank.

Southern blot

Cinco microgramos de ADN total de cada tratamiento se digirieron con *Hind*III y se cargaron a un gel de agarosa a 1%. Después de la electroforesis, el ADN se transfirió a una membrana Hybond N+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por acción capilar usando una solución de 20X de 0.15 M de cloruro de sodio y 0.015 M de citrato de sodio (SSC). Posteriormente, la membrana fue hibridada por UV. La hibridación se llevó a cabo con 500 ng del genoma A de PepGMV-Mo como sonda. La sonda se etiquetó usando AlkPhos Direct™ (Alkphos Direct Hybridization kit, Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE. UU.).

Cuantificación de peróxido de hidrógeno

Una versión modificada del método de sulfato de amonio ferroso /naranja de xilenol (FOX) fue usada para determinar los contenidos de H₂O₂ de los extractos de las hojas, como se reportó anteriormente (Cheeseman, 2006). La mezcla de ensayo después de la adición de la muestra contenía 250 mM de sulfato de amonio ferroso, 100 mM sorbitol, 90% etanol y 100 mM naranja xilenol en 25 mM ácido sulfúrico en un volumen total de 3 mL. El ensayo midió la diferencia de absorbancia entre 550 y 800 nm por al menos 15 min y el color se

(1993), with several modifications. The methanol extracts (2.5 mL) were split into two equal parts, with one part analyzed for free SA and the other for SA conjugate. The final samples were resuspended in 500 μ L methanol, from which 50 μ L was injected into a high-performance liquid chromatographic column (Agilent Technology 1200 series, column Alltima C18 reverse-phase). Step gradient elution was performed using 20 mM sodium acetate (pH 5.0) plus 20% methanol (solvent A) and 20 mM sodium acetate (pH 5.0) plus 70% methanol (solvent B). The separation conditions were the same as those described by Uknes *et al.* (1993): 10 min gradient from 5 to 30% solvent B, 100% B and re-equilibration at 5% B.

Enzyme activity

Protein extraction was performed using phosphate buffer (pH 7.0), and quantification of total proteins was performed as previously described by Peterson (1977). Catalase activity was determined following the generation of O_2 as described by Inamine and Baker (1989). The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 20 g mL^{-1} protein extract in 3 mL solution. The reaction was initiated by adding 10 μ L of 30% [2.2 mM] (w/v) H_2O_2 (reagent grade, SIGMA). POX activity was measured with guaiacol (4 mM, $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) as a substrate in 0.05 mM $C_2H_3NaO_2$ (pH 5.0) at 25 °C. The reaction was initiated using 2.2 mM H_2O_2 . The subsequent oxidation of guaiacol was measured as absorbance change at 470 nm in a spectrophotometer (DU 800; Beckman, Munich, Federal Republic of Germany) for 3 min (Berg and Huystee, 1984).

Statistical analysis

All experiments were performed in six-fold, and the data generated were the results of four separate

mantuvo estable por al menos 1 h. El estándar fue preparado por dilución en 30% H_2O_2 (grado reactivo, SIGMA). La concentración de H_2O_2 en el reactivo fue calibrado con la absorbancia a 240 nm y un coeficiente de extinción de $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Cuantificación de ácido salicílico

El ácido salicílico se extrajo del tejido foliar (0.3 g) y se analizó según lo descrito por Gaffney *et al.* (1993), con varias modificaciones. Los extractos de metanol (2.5 mL) se dividieron en dos partes iguales, con una parte analizada para SA libre y la otra, para SA conjugado. Las muestras finales fueron resuspendidas en 500 μ L metanol, de los cuales se inyectaron 50 μ L en una columna cromatográfica líquida de alto rendimiento (Agilent Technology serie 1200, columna Alltima C18 de fase reversa). La elución en gradiente escalonado se llevó a cabo con 20 mM de acetato de sodio (pH 5.0) más 20% metanol (solvente A) y 20 mM de acetato de sodio (pH 5.0) más 70% metanol (solvente B). Las condiciones de separación fueron iguales a las descritas por Uknes *et al.* (1993): gradiente de 10 min de 5 a 30% solvente B, 100% B y re-equilibrado a 5% B.

Actividad enzimática

La extracción de proteínas se realizó mediante el uso de un amortiguador de fosfato (pH 7.0) y la cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo según lo descrito por Peterson (1977). La actividad de la catalasa se determinó siguiendo la generación de O_2 según lo descrito por Inamine y Baker (1989). La mezcla reactiva contenía 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 7.0) y 20 g mL^{-1} de extracto de proteína en 3 mL de solución. La reacción se inició al agregar 10 μ L de 30% [2.2 mM] (w/v) H_2O_2 (grado reactivo, SIGMA). La actividad de POX se midió con guayacol (4 mM, $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como sustrato en 0.05 mM $C_2H_3NaO_2$

experiments. Enzyme activities, protein, H₂O₂ and SA concentration are mean values from 24 samples.

RESULTS

PepGMV-Mo infection and symptom development

To control environmental variables, an *in vitro* infection protocol was developed for PepGMV-Mo in its compatible host, habanero pepper (*Capsicum chinense*). Typical symptoms associated with PepGMV-Mo infection, were observed in the inoculated plants (Figure 1G-I), however, the symptoms were slightly attenuated. The symptoms associated with PepGMV-Mo infection were visible nine dpi in the inoculated plants. The symptoms observed were leaf curling and mild yellow-green mosaics in the new leaves (Figure 1G). Symptoms were not observed in healthy and mock-inoculated plants (Figure 1A-C and 1D-F). Yellow mosaic and leaf distortion symptoms continued to develop until 24 dpi (Figure 1I). PepGMV-Mo was detected in the new, systemic leaves of the inoculated plants. The samples were analyzed for the detection of PepGMV-Mo of the infected plants. In the infected plants, a 576 bp fragment of the core *Cp* gene was detected using PCR (see methods). Amplification did not occur in samples from mock-inoculated and healthy plants. A total of 15 sequences were selected and compared by pairwise nucleotide identity with the original PepGMV-Mo clone. All of the clones sequenced had 98-100% identity with the original PepGMV-Mo DNA-A clone and 95-98% nucleotide identity with other PepGMV-Mo isolates previously reported in GenBank. Southern blot hybridization was used to evaluate the accumulation of viral DNA. The three expected DNA replicative forms, the open circle, double-

³NaO₂ (pH 5.0) a 25 °C. La reacción inició usando 2.2 mM H₂O₂. La oxidación subsecuente de guayacol se midió como un cambio de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro (DU 800; Beckman, Munich, República Federal de Alemania) por 3 min (Berg y Huystee, 1984).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado y los datos generados fueron los resultados de cuatro experimentos separados. Las actividades enzimáticas, proteínas, H₂O₂ y concentraciones de SA son valores medios de 24 muestras.

RESULTADOS

Infección por PepGMV-Mo y desarrollo de síntomas

Para controlar las variables ambientales, se desarrolló un protocolo de infección *in vitro* para el PepGMV-Mo en su hospedante compatible, el chile habanero (*Capsicum chinense*). Las plantas inoculadas presentaron síntomas típicos asociados a la infección por PepGMV-Mo (Figura 1G-I), aunque los síntomas estaban ligeramente atenuados. Los síntomas asociados con la infección por PepGMV-Mo fueron visibles a los nueve dpi en las plantas inoculadas. Los síntomas observados son el enrollamiento de las hojas y leves mosaicos color verde amarillento en las hojas nuevas (Figura 1G). No se observaron síntomas en plantas sanas o con inoculación simulada (Figuras 1A-C y 1D-F). Los síntomas de mosaico amarillo y de distorsión foliar continuaron desarrollándose hasta 24 dpi (Figura 1I). Se detectó PepGMV-Mo en las nuevas hojas sistémicas de las plantas inoculadas. Se analizaron las muestras para la detección de PepGMV-Mo en

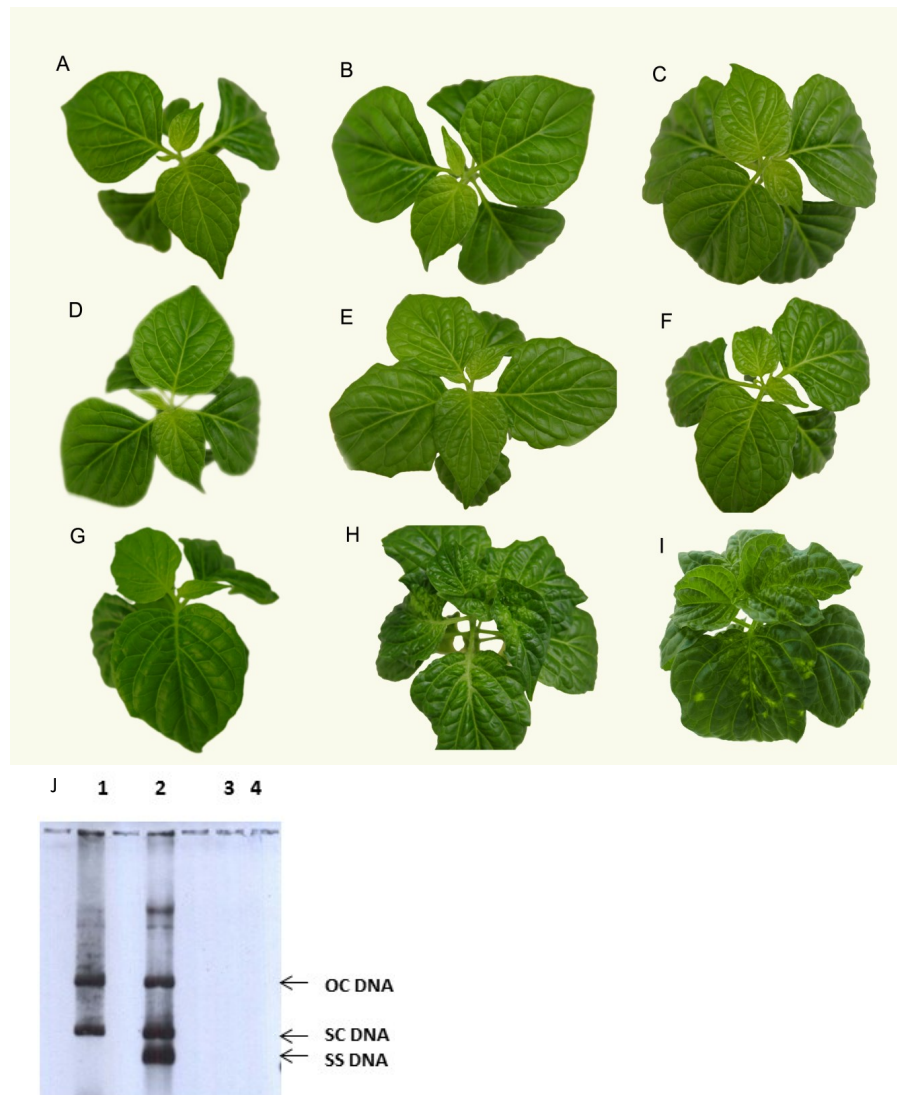


Figure 1. Pepper plants were biolistically inoculated or not inoculated to create three different treatment groups. A. Healthy control plant at time zero; B. Healthy control plant at 9 dpi; C. Healthy plant at 21 dpi; D. Mock-inoculated plant at 0 dpi; E. Mock-inoculated plant at 9 dpi; F. Mock-inoculated plant at 21 dpi; G. PepGMV-Mo-inoculated plant at time zero; H. PepGMV-Mo-inoculated plant at 9 dpi; I. PepGMV-Mo-inoculated plant at 21 dpi. All of the plants were cultivated in basal MS media. J. Viral DNA accumulation. Lane 1, DNA from PepGMV-Mo-inoculated plants at 9 dpi; lane 2, DNA from PepGMV-Mo-inoculated plants at 21 dpi; lane 3, DNA from mock-inoculated plants at 9 dpi; lane 4, DNA from mock-inoculated plants at 21 dpi. The following replicative forms of viral DNA are shown: ssDNA (single-stranded DNA), scDNA (supercoiled dsDNA) and ocDNA (open circular DNA).

Figura 1. Las plantas de chile fueron inoculadas de manera biolística o no inoculadas para formar tres grupos diferentes de tratamiento. A. Planta testigo sana en tiempo cero; B. Planta testigo sana a 9 dpi; C. Planta sana a 21 dpi; D. Planta con inoculación simulada a 0 dpi; E. Planta con inoculación simulada a 9 dpi; F. Planta con inoculación simulada a 21 dpi; G. Planta inoculada con PepGMV-Mo en tiempo cero; H. Planta inoculada con PepGMV-Mo a 9 dpi; I. Planta inoculada con PepGMV-Mo a 21 dpi. Todas las plantas fueron cultivadas en medio MS basal. J. Acumulación de ADN viral. Columna 1, ADN de plantas inoculadas con PepGMV-Mo a 9 dpi; Columna 2, ADN de plantas inoculadas con PepGMV-Mo a 21 dpi; columna 3, ADN de plantas con inoculación simulada a 9 dpi; columna 4, ADN de plantas con inoculación simulada a 21 dpi. Las siguientes formas replicativas de ADN viral se muestran a continuación: ADNmc (ADN monocatenario), ADNse (ADN superenrollado) y ADNca (ADN de círculo abierto).

stranded, and single-stranded forms, were observed in the infected, PepGMV-Mo inoculated plants. While the single-strand form was not observed at 9 dpi, the single- and double-stranded forms were observed at 24 dpi (Figure 1J). These results confirm the validity of the *in vitro* infection system for evaluating the interaction between habanero pepper and PepGMV-Mo. In particular, all of the replicative forms of PepGMV-Mo were detected in the newly developed leaves of all infected plants.

Hydrogen peroxide generation in PepGMV-Mo-infected habanero pepper

After bombardment, H_2O_2 levels increased significantly in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants 30 mpi. In contrast, no increase in H_2O_2 was observed in healthy plants, indicating that the mechanical damage due to the inoculation procedure was responsible for the initial oxidative burst. The content of H_2O_2 in the mock-inoculated and PepGMV-Mo-inoculated plants was 4.6 and 4.8 times greater, respectively, than the content in healthy plants. After this initial increase in H_2O_2 levels, a gradual decrease was observed in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants up to 8 hpi. At 12 hpi, a second peak was observed in the infected plants, with the H_2O_2 content 2.4 and 1.8 times greater than the content in the healthy and mock-inoculated plants, respectively (Figure 2A). Thus, the significant difference in H_2O_2 production could be associated with the presence of the virus in pepper plants. A third peak of H_2O_2 was observed in virus-inoculated plants at 21 dpi that was two times greater than the levels in mock-inoculated and healthy plants (Figure 2B).

Salicylic acid generation in PepGMV-Mo-infected habanero pepper

The levels of SA increased significantly after biolistic inoculation of PepGMV-Mo in inoculated

las plantas infectadas. En las plantas infectadas se detectó un fragmento de 576 bp de la región central del gen *Cp* con el uso de PCR (ver métodos). No existió amplificación en las muestras de plantas sanas o con inoculación simulada. Se seleccionó un total de 15 secuencias, que se compararon mediante identidad de nucleótidos por pares con el clon original del PepGMV-Mo. Todos los clones secuenciados presentaron una identidad de 98-100% con el clon original de ADN-A PepGMV-Mo y 95-98% de identidad nucleótida con otros aislamientos de PepGMV-Mo reportados anteriormente en el GenBank. La hibridación del Southern blot se usó para evaluar la acumulación de ADN viral. Se observaron las tres formas replicativas esperadas del ADN en las plantas infectadas e inoculadas con PepGMV-Mo: el círculo abierto, la doble cadena y una sola cadena. Mientras que la forma de una sola cadena no se observó a 9 dpi, las formas de una y dos cadenas sí fueron observadas a 24 dpi (Figura 1J). Estos resultados confirman la validez del sistema infeccioso *in vitro* para evaluar la interacción entre el chile habanero y PepGMV-Mo. En particular, todas las formas replicativas de PepGMV-Mo fueron detectadas en las hojas recién desarrolladas de todas las plantas infectadas.

Generación de peróxido de hidrógeno en plantas de chile habanero infectadas con PepGMV-Mo.

Después del bombardeo, los niveles de H_2O_2 aumentaron de manera significativa en plantas con inoculación simulada y en las inoculadas con el PepGMV-Mo a los 30 mpi. En contraste, no se observó aumento en H_2O_2 en las plantas sanas, lo cual indica que el daño mecánico debido al procedimiento de inoculación fue el responsable de la explosión oxidativa inicial. El contenido de H_2O_2 en las plantas con inoculación simulada y en las inoculadas con el PepGMV-Mo fue de 4.6 y 4.8 veces mayor, respectivamente, que el contenido en plantas sanas. Después de este aumento inicial en los niveles de H_2O_2 , se observó una reducción gra-

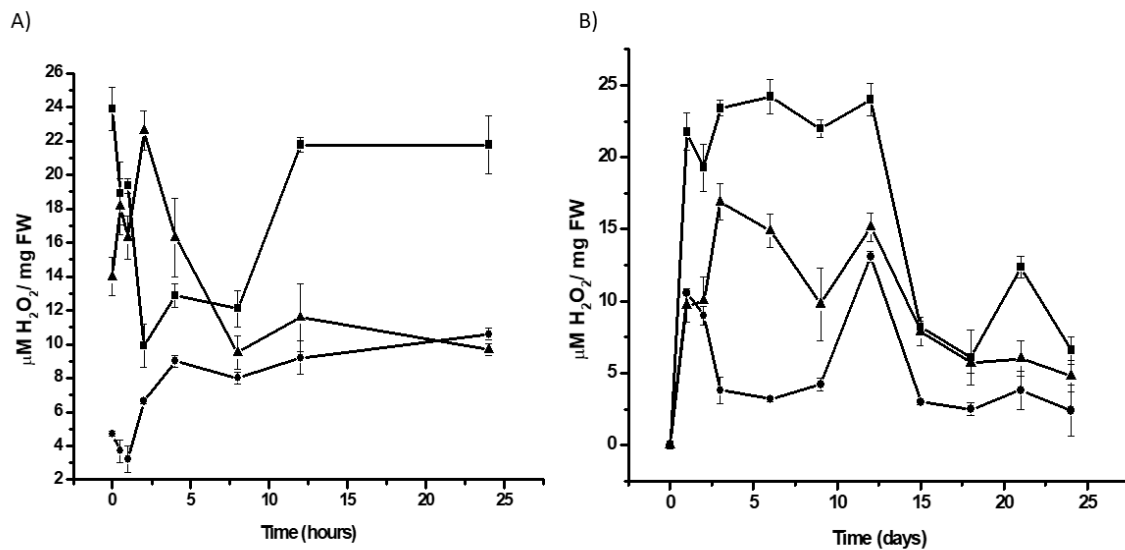


Figure 2. Time-course analysis of the H₂O₂ levels in habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. H₂O₂ content during the early response period after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 2. Análisis de curso-temporal de los niveles de H₂O₂ en plantas de chile habanero inoculadas con PepGMV-Mo. A. Contenido de H₂O₂ durante el periodo de respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inoculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

and mock-inoculated plants. At 30 mpi, the SA content in mock-inoculated and PepGMV-Mo-infected plants was 4.0 and 6.2 times greater, respectively, than the SA content in healthy, non-inoculated control plants. These results clearly indicate that the initial increase in SA and H₂O₂ levels were attributable to the mechanical damage caused by biolistic inoculation. After this initial increase, an 8-fold decrease was observed in the levels of SA up to 8 hpi, both in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants (Figure 3A). At 12 hpi, 4.5- and 7.8- fold increases were observed in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants, respectively, relative to the levels in healthy plants (Figure 3A). Although increases were observed in both mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants, the difference in SA content between them was 58%. This difference suggests that the SA content

dual en plantas con inoculación simulada y en las inoculadas con el PepGMV-Mo hasta 8 hpi. A las 12 hpi, se observó un segundo pico de aumento en las plantas infectadas, con un contenido de H₂O₂ 2.4 y 1.8 veces mayor que el contenido en plantas sanas y con inoculación simulada, respectivamente (Figura 2A). Así, la diferencia significativa en la producción de H₂O₂ podría relacionarse con la presencia del virus en plantas de chile. Se observó un tercer pico de H₂O₂ en las plantas inoculadas con el virus a 21 dpi que fue dos veces mayor que en los niveles en plantas sanas y con inoculación simulada (Figura 2B).

Generación de ácido salicílico en chiles habaneros infectados con PepGMV-Mo

Los niveles de SA aumentaron de forma significativa después de la inoculación por biolística

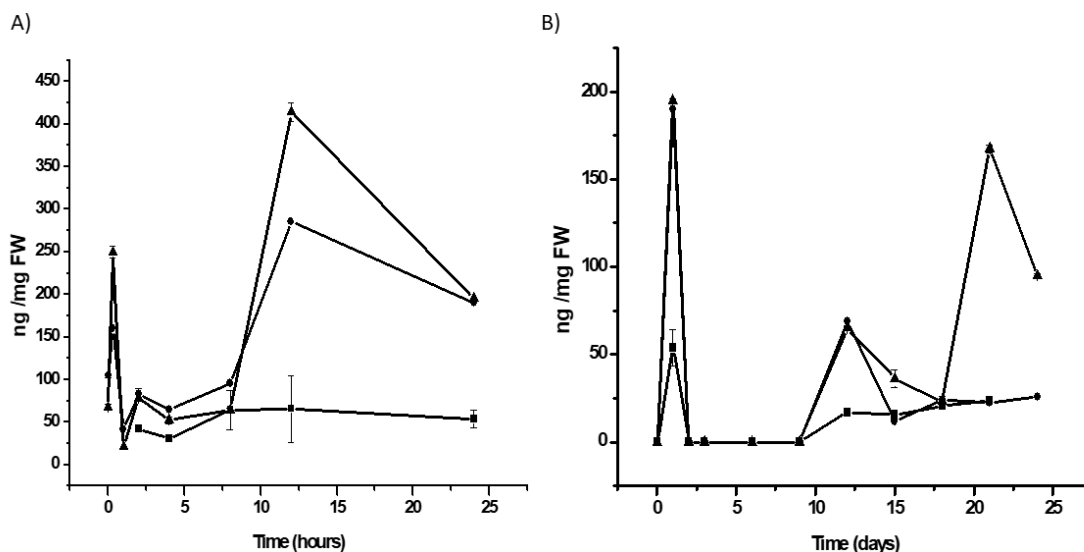


Figure 3. Time course-analysis of the salicylic acid content of habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. SA content during the early response after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 3. Análisis de curso-temporal del contenido de ácido salicílico de plantas de chile habanero inculadas con PepGMV-Mo. A. Contenido de AS durante la respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

at this time point reflects the plant response to the viral infection. As observed with H_2O_2 , a third peak of increase of SA content was observed 21 dpi in PepGMV-Mo-inoculated plants. At this time point, the SA content in the infected plants was 3 times higher than the SA content in healthy and mock-inoculated plants (Figure 3B). The increases in SA and H_2O_2 levels in PepGMV-Mo-infected plants indicate the onset of a late (21 dpi) response corresponding to SAR.

Antioxidative enzyme activity in PepGMV-Mo-infected habanero pepper. Catalase (CAT) activity.

An increase in catalase activity was observed in PepGMV-Mo-infected habanero pepper plants. The activity of this enzyme increased gradually

del PepGMV-Mo en plantas inculadas y con inoculación simulada. A los 30 mpi, el contenido de SA en plantas con inoculación simulada y en las infectadas con el PepGMV-Mo fue 4.0 y 6.2 veces mayor, respectivamente, que el contenido de SA en plantas testigo sanas y no inculadas. Estos resultados indican con claridad que el aumento inicial en los niveles de SA y H_2O_2 se podían atribuir al daño mecánico causado por la inoculación por biolística. Después de este aumento inicial, se observó una reducción de ocho veces en los niveles de SA a las 8 hpi, tanto en plantas con inoculación simulada como en aquellas inculadas con el PepGMV-Mo (Figura 3A). A 12 hpi, aumentos de 4.5 y 7.8 veces se observaron en plantas con inoculación simulada y con inoculación con el PepGMV-Mo, respectivamente, en relación con los niveles observados en plantas sanas (Figura 3A). Si bien se observaron aumentos en plantas con inoculación simulada y en

in PepGMV-Mo-infected plants, with a peak at 4 hpi. At this time point, the CAT activities in the mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants were 2.1 and 4.7 times greater, respectively, than the activity in healthy plants (Figure 4A). CAT activity subsequently decreased in PepGMV-Mo-inoculated plants and gradually increased in control plants. At 12 dpi, the CAT activities in PepGMV-Mo-inoculated, mock-inoculated and healthy plants were similar (Figure 4B), suggesting that CAT activity could be regulated by the increase in SA concentration at 8 hpi (Figure 3A).

Guaiacol peroxidase (POX) activity

Two peaks of POX activity were observed during the first 12 hpi. At the first peak at 4 hpi, POX activity was 3.3 times greater in inoculated plants than in mock-inoculated and healthy plants. At the second peak at 12 hpi, POX activity was 3.5

las inoculadas con el PepGMV-Mo, la diferencia en contenidos de SA entre ellas fue de 58%. Esta diferencia sugiere que el contenido de SA en ese momento refleja la respuesta de la planta a la infección viral. Tal como se observó con H_2O_2 , un tercer pico de aumento del contenido de SA se presentó a los 21 dpi en plantas inoculadas con PepGMV-Mo. En este momento, el contenido de SA en plantas infectadas fue tres veces mayor al contenido de SA en plantas con inoculación simulada e inoculación con PepGMV-Mo (Figura 3B). Los aumentos en los niveles de SA y H_2O_2 en plantas infectadas con PepGMV-Mo indican el inicio de una respuesta tardía (21 dpi) correspondiente a la RSA.

Actividad enzimática antioxidante en chile habanero infectada con PepGMV-Mo. Actividad de Catalasa (CAT).

Se observó un aumento en la actividad de catalasa en plantas de chile habanero infectadas con

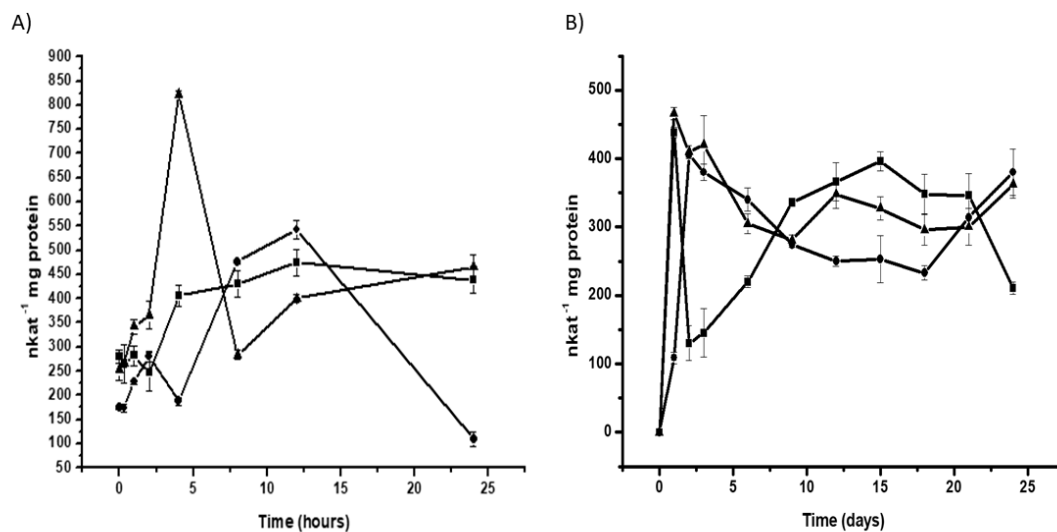


Figure 4. Time-course analysis of the specific activity of catalase in habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. CAT activity during the early response after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 4. Análisis de curso-temporal de la actividad específica de catalasa en plantas de chile habanero inoculadas con PepGMV-Mo. A. Actividad de CAT durante la respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inoculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

and 5.8 times greater in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants, respectively, compared to healthy plants (Figure 5A). The activity of this antioxidant enzyme gradually increased in PepGMV-Mo-inoculated plants over the course of the experiment. At 9 dpi, POX activity was 1.3 and 4.6 times higher in PepGMV-Mo-inoculated plants than in mock-inoculated and healthy plants, respectively (Figure 5B). At 18 dpi, POX activity was 4.7 times greater in inoculated plants than in both mock-inoculated and control plants (Figure 5B).

DISCUSSION

In the present study, we identified responses that occur both early and late after inoculation of habanero pepper with PepGMV-Mo. The development of symptoms in the present study was consistent with previous reports for the PepGMV-Mo isolate (Brown *et al.*, 2005) and all the plants

el PepGMV-Mo. La actividad de esta enzima aumentó de forma gradual en plantas infectadas con PepGMV-Mo, con un pico de aumento a las 4 hpi. En este punto, la actividad de CAT en las plantas con inoculación simulada y con inoculación con el PepGMV-Mo fueron 2.1 y 4.7 veces mayor, respectivamente, que la actividad en plantas sanas (Figura 4A). La actividad de CAT después se redujo en las plantas inoculadas con el PepGMV-Mo y aumentó en las plantas testigo. A los 12 dpi, la actividad de CAT en plantas con inoculación simulada, plantas inoculadas con el PepGMV-Mo y las plantas sanas fueron similares (Figuras 4B), lo que sugiere que la actividad de CAT podría estar regulada por el aumento en la concentración de SA a las 8 hpi (Figura 3A).

Actividad de guayacol peroxidasa (POX)

Se observaron dos picos de aumento de la actividad de POX durante las primeras 12 hpi. En el

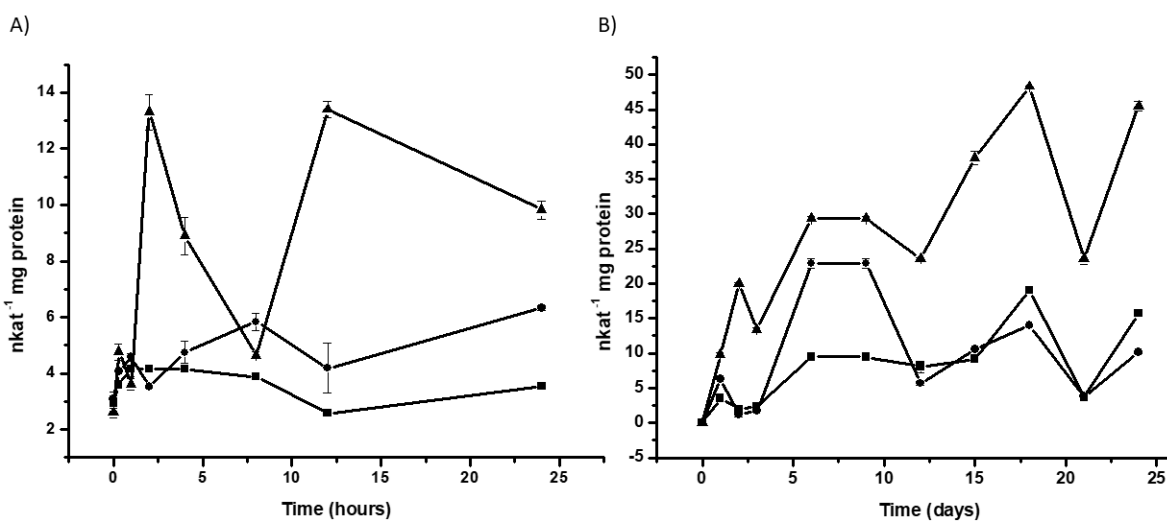


Figure 5. Time-course analysis of the specific activity of peroxidase in habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. POX activity during the early response after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 5. Análisis de curso-temporal de la actividad específica de peroxidasa en plantas de chile habanero inoculadas con PepGMV-Mo. A. Actividad de POX durante la respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inoculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

were susceptible to virus infection. However, some of the symptoms in the *in vitro* system were attenuated due to the different variables affecting these plants.

Little is known about the involvement of ROS in symptom development and pathogenesis in the context of compatible plant-virus interactions. Although a HR was not observed in PepGMV-Mo-infected plants in the present study, an oxidative burst was observed, with three major peaks of increase of H₂O₂ from 30 mpi to 24 dpi. The first peak of increase at 30 mpi was due to mechanical damage caused by biolistic inoculation. Intensive ROS production has been reported in wounded cells and cells subjected to mechanical tension (Olson and Varner, 1993), so it is not surprising that oxidative bursts occurred in all of the treatments 30 min after biolistic inoculation. In plant cell-bacterial interactions, the phase I burst is considered a biologically non-specific reaction (Wojtaszek, 1997). The second peak of increase observed 12 hpi in PepGMV-Mo-infected plants is consistent with previous reports that associate the production of ROS during phase II with a specific HR trigger in non-host resistance (Wojtaszek, 1997). Thus, the second peak of increase can be associated with the PepGMV-Mo infection, the plant response to this infection and symptom development. Previous studies, including a report about *Plum pox virus* (PPV) infection of susceptible peach plants (Hernández *et al.*, 2006), have indicated that increased ROS levels may contribute to symptom development and pathogenesis in compatible plant-virus interactions. In incompatible plant-virus interactions, ROS generation plays an important role in virus resistance. In compatible plant-virus interactions, however, little is known about the involvement of ROS in symptom development and pathogenesis. As previously reported, the generation of ROS is not sufficient to cause a

primer pico de aumento a las 4 hpi, la actividad de POX fue 3.3 veces mayor en plantas inoculadas que en aquellas con inoculación simulada o sanas. En el segundo pico de aumento a las 12 hpi, la actividad de POX fue 3.5 y 5.8 veces mayor en plantas con inoculación simulada y con las inoculadas con el PepGMV, respectivamente, en comparación con plantas sanas (Figura 5A). La actividad de esta enzima antioxidante aumentó de forma gradual en plantas inoculadas con el PepGMV-Mo en el transcurso del experimento. A los 9 dpi, la actividad de POX fue 1.3 y 4.6 veces mayor en plantas inoculadas con PepGMV-Mo que en plantas con inoculación simuladas y sanas, respectivamente (Figura 5B). A los 18 dpi, la actividad de POX fue 4.7 veces mayor en plantas inoculadas que en aquellas con inoculación simulada o plantas testigo (Figura 5B).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, identificamos respuestas que ocurren de forma temprana o de forma tardía después de la inoculación del chile habanero con el PepGMV-Mo. El desarrollo de síntomas en el presente estudio fue consistente con reportes previos del aislado PepGMV-Mo (Brown *et al.*, 2005) y todas las plantas fueron susceptibles a infecciones virales. Sin embargo, algunos de los síntomas en el sistema *in vitro* se vieron atenuados debido a las diferentes variables que afectaban a estas plantas.

Poco se sabe de la intervención de ROS en el desarrollo de síntomas y patogénesis en el contexto de interacciones compatibles planta-virus. Si bien no se observó una RH en plantas infectadas con el PepGMV-Mo en el presente estudio, sí se observó una explosión oxidativa, con tres picos de aumento principales de H₂O₂, a los 30 mpi y hasta los 24 dpi. El primer pico de aumento observado a los 30 mpi

hypersensitive reaction in compatible plant-RNA virus interactions or tissue collapse and restriction of the pathogen at the infection site (Riedle-Bauer, 2000). Similarly, our results demonstrate that in the compatible habanero pepper-PepGMV-Mo interaction, ROS production was not sufficient to confer tolerance, and the disease was able to develop further.

Exogenous SA can induce resistance to viruses even in plants lacking a resistance gene. This resistance is characterized by a decrease in virus yield and a delay in the onset of disease symptoms, and it occurs in the absence of macroscopic cell death or a hypersensitive reaction (Murphy *et al.*, 1999). This suggests that plants possess another mechanism by which SA mediates resistance to viruses. However, increased SA levels at 12 hpi did not inhibit symptom development in the habanero pepper plants infected with PepGMV-Mo *in vitro*. Our results showed that PepGMV-Mo, a DNA virus, can induce an increase in SA in a compatible interaction along with a bimodal response, as previously reported (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011). Additionally, this response can restrict the spread of certain RNA viruses in compatible infections (Murphy and Carr, 2002; Takahashi *et al.*, 2002). Markers for SA signaling, such as PR-1, are up-regulated during systemic infections by several RNA viruses (Huang *et al.*, 2005). CaMV infection, for example, was found to stimulate SA-dependent expression of PR-1, PR-2, and PR-5 in susceptible *Arabidopsis* ecotypes (Laird *et al.*, 2004). DNA viruses have also been found to stimulate SA signaling pathways in both compatible and incompatible interactions. García-Neria and Rivera-Bustamante (2011) reported two peaks of increase at day two and day five post inoculation in the levels of SA in both compatible and incompatible PepGMV infections. They showed that the kinetic of SA production was similar in both resistant and susceptible plants although

se debió al daño mecánico causado por la inoculación biolística. La producción intensiva de EOR ha sido reportado en células heridas y células sujetas a tensión mecánica (Olson y Varner, 1993), por lo que no sorprende que explosiones oxidativas ocurrieran en todos los tratamientos a los 30 min después de la inoculación biolística. En interacciones célula vegetal-bacteria, la fase I de la explosión es considerada una reacción biológicamente no específica (Wojtaszek, 1997). El segundo pico de aumento, observado 12 hpi en plantas infectadas con el PepGMV-Mo, es consistente con reportes previos que asocian la producción de ROS durante la fase II con un disparador de la RH en la resistencia de plantas no hospederas (Wojtaszek, 1997). Así, el segundo pico de aumento puede asociarse con la infección del PepGMV-Mo, con la respuesta de la planta a esta infección y al desarrollo de síntomas. Estudios anteriores, incluyendo un reporte acerca de la infección por *Plum pox virus* (PPV) de plantas de durazno susceptibles (Hernández *et al.*, 2006), indican que niveles altos de ROS pueden contribuir al desarrollo de síntomas y patogénesis en interacciones planta-virus compatibles. En interacciones planta-virus incompatibles, la generación de ROS juega un importante papel en la resistencia al virus. Sin embargo, en interacciones planta-virus compatibles, poco se sabe de la intervención de ROS en el desarrollo de síntomas y en la patogénesis. Previamente se reportó que la generación de ROS no es suficiente para causar una reacción hipersensible en interacciones planta-virus compatibles o el colapso de tejidos y la restricción del patógeno en el sitio de infección (Riedle-Bauer, 2000). De manera similar, los resultados del presente estudio demuestran que en la interacción de chile habanero-PepGMV-Mo compatibles, la producción de ROS no fue suficiente para conferir tolerancia y la enfermedad se pudo desarrollar.

El SA exógeno puede inducir resistencia a virus, incluso en plantas que no poseen un gen de

the concentration on resistant plant was two to three fold higher in inoculated infected tissue. In systemic infected tissue, they observed a bimodal response too, however, in systemic infected tissue, levels of SA were lower than in inoculated infected tissue. Susceptible plants showed two peaks of increase in SA content at day five and day 10-post inoculation. In our work we used susceptible plants in the experiments. In our study, two SA peaks of increase in systemic infected tissue were observed, the first at 12 hpi and the second at 21 dpi. These results were similar to the results find by Garcia-Neria and Rivera-Bustamante (2011), with one peak of increase in the first days after the virus inoculation in susceptible plants and other peak of increase at the end of the time course experiment. Our results suggest that SAR is involved in the compatible interaction between PepGMV-Mo and habanero pepper; however, it was not sufficient to confer resistance to the pepper plants.

Our findings also indicate an interaction between H_2O_2 and SA that results in a self-amplifying system for plant defense: H_2O_2 induces SA accumulation, and SA enhances the levels of H_2O_2 (Van Camp *et al.*, 1998). The increase observed in SA levels 12 hpi in PepGMV-Mo-infected plants was accompanied by increased in H_2O_2 levels. This relationship was confirmed at 21 dpi in infected plants, when an increase in H_2O_2 levels co-occurred with an increase in SA content.

Plants react to virus infections with an upregulation of radical scavenging enzymes, such as SODs, catalases, and peroxidases (Riedle-Bauer, 2000). In plants, the main enzymatic H_2O_2 scavenger of photosynthetic cells is CAT, which converts H_2O_2 into H_2O and O_2 (Quan *et al.*, 2008). An early increase in CAT activity was observed in the compatible interaction between PepGMV-Mo and habanero pepper plants, resulting in an activity level 2 times greater than that of the control at 4

resistencia. Esta resistencia se caracteriza por una reducción en la infectividad del virus y un retraso en el inicio de los síntomas, además de que ocurre en la ausencia de la muerte celular macroscópica o de una reacción hipersensible (Murphy *et al.*, 1999). Esto sugiere que las plantas poseen otro mecanismo por el cual el SA media en la resistencia a los virus. Sin embargo, los niveles mayores de SA a 12 hpi no inhibieron el desarrollo de síntomas en las plantas *in vitro* de chile habanero infectadas con el PepGMV-Mo. Los resultados del presente estudio demostraron que el PepGMV-Mo, un virus de ADN, puede inducir un aumento en SA en una interacción compatible junto con una respuesta bimodal, como ya ha sido reportado (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011). Además, esta respuesta puede restringir la propagación de ciertos virus de ARN en infecciones compatibles (Murphy y Carr, 2002; Takahashi *et al.*, 2002). Los marcadores para la señalización del SA, como el PR-1, son sobre-regulados durante las infecciones sistémicas por varios virus de ARN (Huang *et al.*, 2005). Se encontró que la infección por el CaMV, por ejemplo, estimulaba la expresión dependiente de SA de PR-1, PR-2 y PR-5 en ecotipos susceptibles de Arabidopsis (Laird *et al.*, 2004). También se ha encontrado que los virus de ADN estimulan vías de señalización mediadas por el SA, tanto en interacciones compatibles como incompatibles. Garcia-Neria y Rivera-Bustamante (2011) reportaron dos picos de aumento en los días dos y cinco post-inoculación en los niveles de SA en infecciones de PepGMV tanto compatibles como incompatibles. Estos investigadores demostraron que la cinética de la producción de SA era similar, tanto en plantas resistentes como susceptibles, aunque la concentración en la planta resistente era de dos a tres veces mayor en tejidos infectados. En el tejido infectado sistémico, también observaron una respuesta bimodal, aunque en el tejido sistémico infectado, los niveles de AS

hpi. After this peak, CAT activity was similar to that of control plants. Our results are in contrast to previously reported decreases in catalase activity in *Phaseolus vulgaris* infected with WCIMV and tobacco infected with TMV (Chen *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 2002; Neuenschwander *et al.*, 1995). In cucumber plants inoculated with *Cucumber mosaic virus* (CMV), CAT activity was unaffected (Riedle-Bauer, 1998). The decrease in CAT activity after 4 hpi may have led to the observed increase in H₂O₂ levels and the induction of SAR (Neuenschwander *et al.*, 1995).

Increased POX activity in disease development has been correlated with resistance expression, although increased activity has also been reported in hosts that permit systemic infection (Kozłowska *et al.*, 2001; Riedle-Bauer, 2000). In the present study, peroxidase activity increased throughout the duration of the experiment. A previous study by Milavec *et al.* (2008) demonstrated that in the early period following inoculation of potato plants with *Potato virus Y* (PVY), the virus induced an increase of two times in soluble, ionically-bound and covalently-bound POXs activities, in both tolerant and resistant plants at 3 hpi, while in susceptible plants the POX activity decreased in the early period and the increase was not observed before 24 hpi. In contrast with this last observation, in our work, in susceptible plants infected with PepGMV-Mo, the first increase in POX activity was observed 2 hpi compared to mock inoculation and healthy plants, similar to the results obtained in potato plants tolerant and resistant to the PVY (Milavec *et al.*, 2008). It was reported that in mock-inoculated potato plants susceptible to PTY^{NTN}, soluble and ionically-bound peroxidases decreased in relation to intact plants. The authors proposed that these effects could be the result of injury and due to the effect of substances present in the sap of healthy plants (Milavec *et al.*, 2001). In contrast, we observed that

fueron menores que en el tejido infectado inoculado. Las plantas susceptibles presentaron dos picos de aumento en el contenido de SA en los días 5 y 10 post-inoculación. En el presente trabajo se usaron plantas susceptibles para los experimentos. En este estudio se observaron dos picos de aumento de SA, el primero a las 12 hpi y el segundo, a los 21 dpi. Estos resultados fueron similares a los resultados obtenidos por Garcia-Neria y Rivera-Bustamante (2011), con un pico de aumento en los primeros días después de la inoculación con el virus en plantas susceptibles y otro pico de aumento al final del curso temporal del experimento. Nuestros resultados sugieren que la RSA está involucrada en la interacción compatible entre PepGMV-Mo y el chile habanero, aunque no fue suficiente para conferir resistencia a las plantas de chile.

Nuestros hallazgos también indican una interacción entre el H₂O₂ y el SA, que resulta en un sistema autoamplificante para la defensa de las plantas: el H₂O₂ induce la acumulación de SA, y éste aumenta los niveles de H₂O₂ (Van Camp *et al.*, 1998). El aumento en los niveles observados de SA a las 12 hpi en plantas infectadas con PepGMV-Mo estuvo acompañado de aumentos en los niveles de H₂O₂. Esta relación fue confirmada a los 21 dpi en plantas infectadas, cuando un aumento en los niveles de H₂O₂ ocurrió de forma simultánea con un aumento en el contenido de SA.

Las plantas reaccionan a las infecciones virales con una sobrerregulación de enzimas depuradoras de radicales libres, como SODs, catalasas y peroxidases (Riedle-Bauer, 2000). En las plantas, el principal depurador enzimático de H₂O₂ de células fotosintéticas es la CAT, que convierte al H₂O₂ en H₂O y O₂ (Quan *et al.*, 2008). Se observó un aumento temprano en la actividad de CAT en la interacción compatible entre PepGMV-Mo y las plantas de chile habanero, lo cual resultó en un nivel de actividad 2 veces mayor al del testigo a las 4 hpi. Tras este

total POX activity increases in mock-inoculated, in relation to healthy plants. These differences could be due to the use of different mock inoculation. In the Milavec *et al.* (2001) report, they used healthy plant's sap as mock inoculation and we used the Bluescript cloning vector as mock inoculation. This last treatment does not contain the substances present in the sap that could inactivate the POX activity. Riedle-Bauer (2000) reported that in susceptible plants of *Cucumis sativa* and *Cucurbita pepo* infected with *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), total POX activity increased 14 and six times in infected plants 20 dpi, respectively, in systemic leaves displayed viral symptoms, with an increase in H₂O₂ accumulation. Similar results were obtained in our work. POX activity in systemic leaves continued to increase through the time course experiment, with a higher activity observed between 18 to 24 dpi. This POX activity increase was related with an increase in H₂O₂ accumulation at 24 dpi. These results suggest that total peroxidase activity are involved in H₂O₂ production during plant-virus interactions (Riedle-Bauer, 2000). Peroxidases have long been postulated to produce H₂O₂ (Milavec *et al.*, 2008; Elstner and Heupel, 1976). More recently, cell wall peroxidases have been found to be responsible for some, if not all, of the H₂O₂ produced in the oxidative burst (Hernández *et al.*, 1993; Bestwick *et al.*, 1997; Bolwell *et al.*, 1995). Taken together, our data indicate that increased of antioxidant defense is not enough to confer resistance or tolerance to habanero pepper plants in the compatible interaction with PepGMV-Mo and that the symptoms observed may be related to this increase. How the increases in H₂O₂, SA, and POX activity at 21 dpi are related to symptom remission will require further investigation, preferably in an *in vivo* system.

pico, la actividad de CAT fue similar a la de las plantas testigo. Nuestros resultados contrastan con las reducciones ya reportadas para la actividad de la catalasa en *Phaseolus vulgaris* infectado con el WCIMV y en tabaco infectado con el TMV (Chen *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 2002; Neuenschwander *et al.*, 1995). En plantas de pepino inoculadas con *Cucumber mosaic virus* (CMV), la actividad de CAT no fue afectada (Riedle-Bauer, 1998). La reducción de CAT después de 4 hpi puede haber conducido al aumento observado en niveles de H₂O₂ y la inducción de RSA (Neuenschwander *et al.*, 1995).

El aumento en la actividad de las POX en el desarrollo de la enfermedad se ha correlacionado con la expresión de resistencia, aunque también se ha reportado un aumento de actividad en hospedantes que permiten la infección sistémica (Kozłowska *et al.*, 2001; Riedle-Bauer, 2000). En el presente estudio, la actividad de la peroxidasa aumentó a lo largo del experimento. Un estudio previo, realizado por Milavec *et al.* (2008), demostró que en el periodo temprano, después de la inoculación de plantas de papa con *Potato virus Y* (PVY), el virus indujo un aumento de dos veces en la actividad de las POX solubles, POX unidas iónicamente y POX unidas covalentemente a las 3 hpi, mientras que en plantas susceptibles, la actividad de las POX disminuyó en el periodo temprano y el aumento no se observó antes de las 24 hpi. En contraste con esta última observación, en el presente trabajo, en las plantas susceptibles infectadas con PepGMV-Mo, el primer aumento en la actividad de POX se observó a las 2 hpi en comparación con la inoculación simulada y con plantas sanas, similar a los resultados obtenidos para plantas de papa tolerantes y resistentes al PVY (Milavec *et al.*, 2008). Previamente se reportó que en plantas de papa con inoculación simulada y susceptibles a PTY^{NTN}, las peroxidases solubles y las unidas iónicamente disminuyeron en relación

CONCLUSIONS

Our *in vitro* results demonstrate that habanero pepper plants respond to the compatible virus PepGMV-Mo by activating the synthesis and accumulation of H₂O₂ and SA and increasing the activity of CAT and POX. Furthermore, the SAR pathway was activated but insufficient to confer resistance to the habanero pepper plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank CONACyT for Grant #106105 and for the doctoral scholarship awarded to Cristina Aguilar-Sánchez. We also thank Dr. Rafael Rivera-Bustamante for providing us with the infectious clones of PepGMV, Dr. Rosa Maria Escobedo-Gracia Medrano for her critical comments, and M.C. Miriam Monforte-González for her technical support.

LITERATURE CITED

- Baebler S, Witek K, Petek M, Stare K, Tusek-Znidaric M, Pompe-Novak M, Renaut J, Szajko K, Strzelczyk-Żyta D, Marczewski W, Morgiewicz K, Gruden K and Hennig J. 2014. Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against *Potato virus Y* infection in potato. *Journal of Experimental Botany* 65 (4): 1095-1109. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert447>.
- Barboza N, Blanco-Meneses M, Esker P, Moriones E and Inoue-Nagata AK. 2018. Distribution and diversity of begomoviruses in tomato and sweet pepper plants in Costa Rica. *Annals of Applied Biology* 172 (1): 20-32. <https://doi.org/10.1111/aab.12398>.
- Berg BM and Huystee RB. 1984. Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of peroxidase from petunia. *Physiologia Plantarum* 60 (3): 299-304. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06066.x>.
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH and Mansfield JW. 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell* 9 (2): 209-221. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.209>.
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR and Zimmerlin A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23:517-532. <https://doi.org/10.3109/10715769509065273>.
- Brown JK, Idris AM, Ostrow KM, Goldberg N, French R and Stenger DC. 2005. Genetic and phenotypic variation of the *Pepper golden mosaic virus* complex. *Phytopathology* 95 (10):1217-1224. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1217>.
- con las plantas intactas. Los autores propusieron que estos efectos pudieran ser el resultado de lesiones y del efecto de sustancias presentes en la savia de plantas sanas (Milavec *et al.*, 2001). En contraste, se observó que la actividad total de las POX aumenta en plantas con inoculación simulada en relación con plantas sanas. Estas diferencias podrían deberse al uso de diferentes inoculaciones simuladas. En el reporte de Milavec *et al.* (2001) usaron la savia de la planta sana como inoculación simulada y en este trabajo usamos el vector de clonación Bluescript como inoculación simulada. Este último tratamiento no contiene las sustancias presentes en la savia que podrían desactivar la actividad de las POX. Riedle-Bauer (2000) reportó que en las plantas susceptibles de *Cucumis sativa* y *Cucurbita pepo* infectadas con el *Cucumber mosaic virus* (CMV) y el *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), la actividad total de POX aumentó 14 y 6 veces en plantas a los 20 dpi, respectivamente, mientras que las hojas sistémicas presentaron síntomas virales, con un aumento en la acumulación de H₂O₂. En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares. La actividad de POX en hojas sistémicas continuó en aumento a lo largo del curso temporal del experimento, con una mayor actividad observada entre los 18 y 24 dpi. Este aumento en la actividad de POX se relacionó con un aumento en la acumulación de H₂O₂ a 24 dpi. Estos resultados sugieren que la actividad total de las peroxidasas está involucrada en la producción de H₂O₂ durante las interacciones planta-virus (Riedle-Bauer, 2000). Desde hace mucho tiempo se ha sugerido que las peroxidasas producen H₂O₂ (Milavec *et al.*, 2008; Elstner y Heupel, 1976). Más recientemente se encontró que las peroxidasas de las paredes celulares son responsables de al menos parte del H₂O₂ producido en la explosión oxidativa (Hernández *et al.*, 1993; Bestwick *et al.*, 1997; Bolwell *et al.*, 1995). Tomados de manera conjunta, los datos obtenidos

- Carrillo-Tripp J, Lozoya-Gloria E and Rivera-Bustamante RF. 2007. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 97 (1): 51-59. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0051>.
- Clark D, Durner J, Navarre D and Klessig D. 2007. Nitric Oxide inhibition of tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13 (12): 1380-1384. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.12.1380>.
- Clarke SF, Guya PL, Burritta DJ and Jameson PE. 2002. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum* 114 (2): 157-164. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140201.x>.
- Cheeseman J. 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57 (10): 2435-2444. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl004>.
- Chen Z, Silva H and Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262 (5141): 1883-1886. <http://doi.org/10.1126/science.8266079>.
- Chivasa S, Murphy AM, Naylor M and Carr JP. 1997. Salicylic acid interferes with *Tobacco mosaic virus* replication via a novel Salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *Plant Cell* 9 (4): 547-557. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.547>.
- Dempsey DA and Klessig DF. 1995. Signals in plant disease resistance. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 93 (3): 167-186. [https://doi.org/10.1016/0020-2452\(96\)81488-6](https://doi.org/10.1016/0020-2452(96)81488-6).
- Echevarría-Machado I, Sánchez-Cach LA, Hernández-Zepeda C, Rivera-Madrid R and Moreno-Valenzuela OA. 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissue. *Molecular Biotechnology* 31 (2): 129-136. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:129>.
- Elstner EF and Heupel A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 130 (1): 175-180. <https://doi.org/10.1007/BF00384416>.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H and Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261 (5122): 754-756. <http://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>.
- García-Neria MA and Rivera-Bustamante RF. 2011. Characterization of *Geminivirus* resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24 (2): 172-182. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0126>.
- Hernández-Espinal LA, Enríquez-Verdugo I, Melgoza-Villagómez CM, Retes-Manjarrez JE, Velarde-Félix S, Linares-Flores PJ and Garzón-Tiznado JA. 2018. Análisis filogenético y distribución de begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Fitotecnia Mexicana* 41(2): 149-157. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.149-157>.
- Hernández JA, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA and Sevilla F. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum* 89 (1): 103-110. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01792.x>.

indican que los aumentos en las defensas antioxidantes no son suficientes para conferir resistencia o tolerancia para las plantas de chile habanero en la interacción compatible con PepGMV-Mo y que los síntomas observados podrían estar relacionados con este aumento. La manera en que los aumentos en la actividad de H₂O₂, SA y POX a los 21 dpi se relacionan con la remisión de síntomas requerirá de más investigación, de preferencia en un sistema *in vivo*.

CONCLUSIONES

Los resultados *in vitro* demuestran que las plantas de chile habanero responden al virus compatible PepGMV-Mo al activar la síntesis y acumulación de H₂O₂ y SA y al aumentar la actividad de CAT y POX. Asimismo, la vía de RSA se activó pero es insuficiente para conferir resistencia a las plantas de chile habanero.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACyT por la Beca de doctorado #106105 y por la beca de doctorado entregada a Cristina Aguilar-Sánchez. Nuestros agradecimientos también para el Dr. Rafael Rivera-Bustamante por donarnos los clones infecciosos de PepGMV, a la Dra. Rosa María Escobedo-Gracia Medrano por sus comentarios críticos y a la M.C. Miriam Monforte-González por su apoyo técnico.

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

Hernández JA, Díaz-Vivancos P, Rubio M, Olmos E, Ros-Barceló A and Martínez-Gómez P. 2006. Long-term *Plum pox virus* infection produces an oxidative stress in a susceptible apricot *Prunus armeniaca*, cultivar but not in a resistant cultivar. *Physiologia Plantarum* 126 (1): 140-152. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00581.x>.

- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007a. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology* 56 (5): 763-770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01652.x>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007b. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes* 35 (3): 825-833. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>.
- Huang ZL, Yeakley JM, García EW, Holdridge JD, Fan JB and Whitham SA. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. *Plant Physiology* 137 (3): 1147-1159. <https://doi.org/10.1104/pp.104.056028>.
- Idris AM, Smith SE and Brown JK. 2001. Ingestion, transmission and persistence of *Chino del Tomate virus* (CdTV), a New World begomovirus, by Old and New World biotypes of the whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Annals of Applied Biology* 139 (1): 145-154. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00139.x>.
- Inamine GS and Baker JE. 1989. A catalase from tomato fruit. *Phytochemistry* 28 (2): 345-348. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80010-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80010-X).
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW and Li HY. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrated Plant Biology* 50 (1): 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>.
- Klessig DF, Choi HW and Dempsey DA. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Molecular Plant Microbe Interaction* 31 (9): 871-888.
- Kozłowska M, Fryder K and Wolko B. 2001. Peroxidase involvement in the defense response of red raspberry to *Dymellia applanata* (Niessl/Sacc.). *Acta Physiologiae Plantarum* 23 (3): 303-310. <https://doi.org/10.1007/s11738-001-0037-6>.
- Laird J, Armengaud P, Giuntini P, Laval V and Milner JJ. 2004. Inappropriate annotation of a key defense marker in Arabidopsis: will the real PR-1 please stand up? *Planta* 219 (6): 1089-1092. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1355-x>.
- Lukan T, Baebler S, Pompe-Novak M, Guček K, Zagorščak M, Coll A and Gruden K. 2018. Cell death is not sufficient for the restriction of *Potato virus Y* spread in hypersensitive response-conferred resistance in potato. *Frontiers in Plant Science* 9:1-12 <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00168>.
- Mandal S, Kumar Das R and Mishra S. 2011. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (2): 117-223. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.10.006>.
- Mayers CN, Lee KC, Moore CA, Wong SM and Carr JP. 2005. Salicylic acid induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in Squash and *Arabidopsis thaliana*: Contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 18 (5): 428-434. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0428>.
- Mejía-Teniente L, Durán-Flores BA, Torres-Pacheco I, González-Chavira MM, Rivera-Bustamante RF, Feregrino-Pérez AA, Pérez-Ramírez I, Rocha-Guzmán NE, Reynoso-Camacho R and Guevara-González RG. 2019. Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annum* L.) against Pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.11.008>.
- Méndez-Lozano J, Rivera-Bustamante RF, Fauquet CM and De la Torre-Almaráz R. 2001. *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus* are Geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in Mexico. *Plant Disease* 85 (12): 1291. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1291A>.
- Miguel E, Poza-Carrión C, López-Solanilla E, Aguilar I, Llama-Palacios A, García-Olmedo F and Rodríguez-Palenzuela P. 2000. Evidence against a direct antimicrobial role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13 (4): 421-429. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.421>.
- Milavec M, Gruden K, Ravnikar M and Kovač M. 2008. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by *Potato virus Y*. *Plant Pathology* 57 (5): 861-869. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01833.x>.
- Milavec M, Ravnikar M and Kovac M. 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with *Potato virus Y<sup>NTN</sup>*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (10): 891-898. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01303-1](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01303-1).
- Murphy AM and Carr JP. 2002. Salicylic acid has cell-specific effects on *Tobacco mosaic virus* replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiology* 128 (2): 552-563. <https://doi.org/10.1104/pp.010688>.
- Murphy AM, Chivasa S, Singh DP and Carr JP. 1999. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends in Plant Science* 4 (4): 155-160. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01390-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01390-4).
- Nakhla MK, Sorensen A, Mejía L, Ramirez P, Karkashian JP and Maxwell DP. 2005. Molecular characterization of tomato infecting Begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *Acta Horticulture* 695 (31): 277-288. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.31>.
- NCBI. 2021. National Center for Biotechnology Information. [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).
- Neuenschwander U, Verooij L, Friedich S, Uknes H and Kessmann Ryals J. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant Journal* 8 (2): 227-233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.08020227.x>.
- Olson PD and Varner JE. 1993. Hydrogen peroxide and lignifications. *Plant Journal* 4 (5): 887-892. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04050887.x>.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S and Klessig D. 2007. Methyl Salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318 (5847): 113-116. <http://doi.org/10.1126/science.1147113>.

- Peterson G. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al*, which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83 (2): 346-356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).
- Riedle-Bauer M. 1998. Activities of antioxidant enzymes in cucumber plants infected with *Cucumber mosaic virus*. *Phyton* 38 (1): 149–157. [https://www.zobodat.at/pdf/PHY\\_38\\_1\\_0149-0157.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/PHY_38_1_0149-0157.pdf).
- Riedle-Bauer M. 2000. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *Journal of Phytopathology* 148 (5): 297-302. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00503.x>.
- Rodrigues-Alencar MS, Da Silva-Solino AJ, Batista-Oliveira JS, Pascholati SJ and Freitas-Schwan-Estrada KR. 2020. Induction of defense mechanisms in tomato plants by saprobic fungi filtrates against early blight disease. *Revista Caatinga* 33 (3): 671– 678. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n310rc>.
- Rodríguez-Negrete EA, Carrillo-Tripp J and Rivera-Bustamante RF. 2009. RNA Silencing against Geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of Virology* 83 (3): 1332-1340. <https://doi.org/10.1128/JVI.01474-08>.
- Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Takeda M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y and Dinesh-Kumar SP. 2002. RCY1, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to *Cucumber mosaic virus* requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant Journal* 32 (5): 655–667. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01453.x>.
- Uknes S, Winter AM, Delaney T, Vernooij B, Morse A, Friedrich L, Nye G, Potter S, Ward E and Ryals J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6 (6): 692-698. [https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1993Articles/Microbe06\\_692.pdf](https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1993Articles/Microbe06_692.pdf).
- Van Camp W, Van Montagu M and Inzé D. 1998. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3 (9): 330-334. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01297-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01297-7).
- Wohlgemuth H, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, Kangasjärvi J, Sandermann H and Langebartels C. 2002. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell and Environment* 25 (6): 717-726. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00859.x>.
- Wojtaszek P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense response. *Acta Physiologiae Plantarum* 19 (4): 581-589. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11738-997-0057-y.pdf>.

# Phytochemical profile and *in vitro* activity of *Agave angustifolia* and *A. cupreata* extracts against phytopathogenic fungi

## Perfil fitoquímico y actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Agave angustifolia* y *A. cupreata* contra hongos fitopatógenos

Anayareth Almazán-Morales, Ma. Elena Moreno-Godínez, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, <sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, C.P. 39087, México; Elías Hernández-Castro, Mirna Vázquez-Villamar, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Autónoma de Guerrero. Carretera Iguala-Teloloapan S/N, Iguala de la Independencia, Guerrero, C.P. 40040, México; José Antonio Mora-Aguilera, Eugenia Cabrera-Huerta Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillos, Texcoco, C.P. 56230, México; <sup>1</sup>Patricia Alvarez-Fitz\*, Cátedras CONACyT.

\*Corresponding author: palvarezfi@conacyt.mx.

Received: February 25, 2022.

Accepted: April 08, 2022.

Almazán-Morales A, Moreno-Godínez ME, Hernández-Castro E, Vázquez-Villamar M, Mora-Aguilera JA, Cabrera-Huerta E and Alvarez-Fitz P. 2022. Phytochemical profile and *in vitro* activity of *Agave angustifolia* and *A. cupreata* extracts against phytopathogenic fungi. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 169-187.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-6>

Primera publicación DOI: 20 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 20, 2022.

**Abstract.** Phytopathogenic fungi can cause economic losses. The application of natural products from species of the genus *Agave* is an alternative for controlling these organisms. The present study aimed to determine the phytochemical profile of *Agave angustifolia* and *A. cupreata* extracts and to evaluate their antifungal

**Resumen.** Los hongos fitopatógenos pueden causar pérdidas económicas. La aplicación de productos naturales de especies del género *Agave* constituye una alternativa para el control de estos organismos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil fitoquímico de extractos de *Agave angustifolia* y *A. cupreata*, así como evaluar su actividad antifúngica contra varias especies de hongos fitopatógenos. Se obtuvo el extracto acuoso de las hojas de *A. angustifolia* y acetónico de *A. cupreata*. El perfil fitoquímico se determinó por cromatografía en capa fina y se evaluó la inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas. El tamizaje reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y triterpenos. El extracto acetónico de *A. cupreata* inhibió el 76, 60 y 59% del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia viticola*, *Colletotrichum* sp., y *Epicoccum sorghinum* respectivamente a 8 y 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), mientras que el porcentaje de producción de esporas disminuyó

activity against several species of phytopathogenic fungi. The aqueous extract from *A. angustifolia* and the acetonic extract from *A. cupreata* were studied. The phytochemical profile was determined by thin-layer chromatography. Mycelial growth inhibition and spore production were evaluated. Phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, flavonoids, saponins, and triterpenes. The acetonic extract of *A. cupreata* inhibited 76, 60, and 59% of the mycelial growth of *Lasiodiplodia viticola*, *Colletotrichum* sp., and *Epicoccum sorghinum*, respectively, at 8 and 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), while spore production decreased by 92 and 86 % (p≤0.001) for *Fusarium subglutinans* and *Colletotrichum* sp., respectively. The aqueous extract of *A. angustifolia* inhibited 40% of the mycelial growth of *E. sorghinum* at 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) and reduced the spore production of *L. viticola* by 35% (p≤0.001). The results indicate that the extracts under study can be an alternative source of antifungal compounds.

**Key words:** *Agave*, phytopathogenic fungi, *in vitro* inhibition.

According to some estimates, the world population will reach 9.7 billion by 2050. Agricultural production will have to increase to meet the increased demand for food (United Nations, 2019). A worldwide problem working against increased agricultural production is the damaging effect of diseases caused by pathogens that reduce harvest yields and in extreme cases cause the death of crops (Jain *et al.*, 2019). These pathogens include nematodes, phytoplasmas, viruses, bacteria, and fungi (Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). Phytopathogenic fungi are one of the main infectious agents of crops during pre-harvest, harvest and post-harvest stages (transport, storage

92 y 86 % (p≤0.001) para *Fusarium subglutinans* y *Colletotrichum* sp., respectivamente. El extracto acuoso de *A. angustifolia* inhibió 40% del crecimiento micelial de *E. sorghinum* a 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) y disminuyó en 35% (p≤0.001) la producción de esporas de *L. viticola*. Los resultados indicaron que los extractos representan una alternativa para obtención de compuestos antifúngicos.

**Palabras clave:** *Agave*, hongos fitopatógenos, inhibición *in vitro*.

Se estima que la población mundial para el año 2050 aumente hasta alcanzar los 9,700 millones; por lo que la demanda de alimentos crecerá y será necesario aumentar la producción agrícola para garantizar y satisfacer la alimentación de la población (United Nations, 2019). Sin embargo, una problemática que enfrenta la agricultura en el mundo son las enfermedades provocadas por patógenos que reducen las cosechas y en casos extremos provocan la muerte de los cultivos (Jain *et al.*, 2019). Entre los patógenos que causan enfermedades se encuentran los nematodos, fitoplasmas, virus, bacterias y hongos (Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). Los hongos fitopatógenos son de los principales agentes infecciosos en los cultivos durante la pre cosecha, cosecha y post cosecha (transporte, almacenamiento y comercialización) siendo estos responsables de cuantiosas pérdidas económicas (Juárez *et al.*, 2010). Dentro las especies de hongos fitopatógenos que son consideradas de importancia agrícola por infectar una gran variedad de cultivos y provocar problemas de calidad, valor nutricional o de características sensoriales se encuentran *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Epicoccum sorghinum*, *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Monilinia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Colletotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Phomopsis* spp. y *Phytophthora*

and marketing), causing very significant economic losses (Juárez *et al.*, 2010). Among the species of phytopathogenic fungi that are considered of agricultural importance because they infect a wide variety of crops and affect the quality, nutritional value and sensory characteristics of agricultural products are *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Epicoccum sorghinum*, *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Monilinia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Colletotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Phomopsis* spp., and *Phytophthora* spp. (De Oliveira *et al.*, 2021). Many agricultural products are susceptible to these pathogens, which cause necrotic lesions on the leaves (leaf spots), gummosis, vascular wilt, rot, decay, and extensive necrosis (Nachilima *et al.*, 2020; Palma-Guerrero *et al.*, 2021). Chemical fungicides are the most widely used method for controlling these phytopathogenic fungi due to their quickness and effectiveness. However, frequent application of these compounds has led to the development of resistance in various fungal strains and has negative effects on human health and the environment (Zubrod *et al.*, 2019). In Mexico, there are an estimated 10,000-13,000 endemic plants that have various biological properties (antioxidant, antibacterial, anticancer, and antifungal activity, among others). The extracts or compounds (alone or in combination) obtained from them are important for the pharmaceutical, food and agricultural industries. The latter is constantly looking for new fungicides of natural origin that can be used in the field and that can bring added value to endemic plants. Scientific interest in the use of plant products such as essential oils, organic extracts and purified compounds has increased in recent years. These products are recommended as safe alternatives to synthetic fungicides and as an important element of sustainable agricultural practices (Tapia-Quirós *et al.*, 2020; Mui Yun Wong *et al.*, 2020). The antifungal potential of various plant extracts

spp. (De Oliveira *et al.*, 2021). Muchos productos agrícolas son susceptibles a estos patógenos que provocan lesiones necróticas en las hojas (manchas foliares), gomosis, marchitez vascular, podredumbre, pudrición y necrosis extensivas (Nachilima *et al.*, 2020; Palma-Guerrero *et al.*, 2021). Los fungicidas químicos constituyen el método de control más empleado para su control, debido a su rapidez y efectividad. Sin embargo, su aplicación frecuente ha provocado que las cepas desarrollen resistencia, además de afectar negativamente la salud humana e impacto ambiental (Zubrod *et al.*, 2019). En México, se estiman de 10,000-13,000 plantas endémicas que presentan diversas propiedades biológicas (antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, antifúngica, entre otras), y los extractos o compuestos (solos o en combinación) obtenidos de ellas son importantes para las industrias farmacéutica, alimentaria y agrícola. Particularmente en esta última, se buscan nuevas alternativas de fungicidas naturales que puedan ser utilizados en campo, además de conferir un valor agregado a las plantas endémicas. Por lo anterior, el uso de productos derivados de plantas como aceites esenciales, extractos orgánicos y compuestos purificados han adquirido un interés científico relevante, ya que son recomendados como alternativas seguras en comparación con los fungicidas sintéticos, además de impulsar la agricultura sostenible (Tapia-Quirós *et al.*, 2020; Mui Yun Wong *et al.*, 2020). En este sentido, se ha evaluado el potencial antifúngico de los extractos de varias plantas (*Larrea tridentata*, *Tagetes lucida*, *Flourensia cernua*, *Acaciella angustissima*, *Jatropha cuneata*, *Yucca filifera*) contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotium* spp., entre otros y se ha determinado que inducen inhibición de 30-100% del crecimiento micelial (Asael *et al.*, 2018).

Los agaves son plantas que tienen importancia social, ecológica y económica alta por ofrecer más

(*Larrea tridentata*, *Tagetes lucida*, *Flourensia cernua*, *Acaciella angustissima*, *Jatropha cuneata*, *Yucca filifera*) was evaluated against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotium* spp., among others, and it was reported that they induced 30-100% inhibition of mycelial growth (Asael *et al.*, 2018).

Agaves are plants with high social, ecological, and economic importance. They are used in more than 100 different ways, such as food, drink, medicine, decoration, fiber, fuel, fertilizer, and construction material, among others. Their ecological importance lies in their ability to limit rainwater runoff, reduce soil erosion, capture carbon, and offer shelter and food to a wide range of animal species, from insects to mammals. Their most important use is as raw material for the production of distilled beverages such as mezcal, tequila, sotol, charanda, and bacanora (García-Mendoza, 2007; Barrientos-Rivera *et al.*, 2019). These plants are characterized by synthesizing secondary metabolites such as fatty acids, terpenes, coumarins, triterpenes, steroids, tannins, flavonoids, glycosides, fructans, saponins, and alkaloids, which are responsible for their various biological activities (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021). The antifungal activity of the genus *Agave* has been evaluated against fungi of agricultural importance such as *Postia placenta*, *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Mucor* spp., *Fusarium* spp., and *Penicillium* spp. (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021).

In Guerrero, Mexico, the “piña” of *A. angustifolia* and *A. cupreata* is traditionally used for the production of mezcal. However, the leaves, which represent 46% of the total weight of the plant, are not used in any other process and become a waste product (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001). Recent studies have shown that the leaves

de 100 formas de uso, ya sea como alimento, bebida, medicina, ornato, fibra, combustible, fertilizante y vivienda, entre otras. Su importancia ecológica radica en limitar el escurrimiento pluvial del agua de lluvia, reducir la erosión del suelo, son captadores de carbono, ofrecen refugio y alimento a una amplia gama de especies animales, desde insectos hasta mamíferos. Sin embargo, el mayor aprovechamiento es por usarse como materia prima para la producción de bebidas destiladas como el mezcal, tequila, sotol, charanda y bacanora (García-Mendoza, 2007; Barrientos-Rivera *et al.*, 2019). Estas plantas se han caracterizado por sintetizar metabolitos secundarios como ácidos grasos, terpenos, cumarinas, triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, glucósidos, fructanos, saponinas y alcaloides responsables de sus diversas actividades biológicas (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021). Entre estas, se ha evaluado la actividad antifúngica del género *Agave* contra hongos de importancia agrícola como: *Postia placenta*, *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Mucor* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021).

En Guerrero, México, tradicionalmente se usa la piña de *A. angustifolia* y *A. cupreata*, para la producción de mezcal. Sin embargo, las hojas, que representan el 46 % del total del peso de la planta, no se utilizan en ningún otro proceso convirtiéndose en un producto de desecho (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001). Estudios recientes han demostrado que las hojas de *A. cupreata*, contienen antronas, antraquinonas, cumarinas, alcaloides, aceites esenciales, compuestos pungentes y saponinas, y también se ha evaluado su actividad antibacteriana y antiinflamatoria (Salazar-Pineda *et al.*, 2017); mientras de las hojas de *A. angustifolia* se han aislado triterpenos ( $\beta$ -sitosterol), saponinas esteroidales (agliconas o glicosiladas) y fructanos y se ha evaluado la actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antiulcero-



of *A. cupreata* contain anthrones, anthraquinones, coumarins, alkaloids, essential oils, pungent compounds, and saponins, which have antibacterial and anti-inflammatory activity (Salazar-Pineda *et al.*, 2017). Triterpenes ( $\beta$ -sitosterol), steroidal saponins (aglycones or glycosylated), and fructans have been isolated from the leaves of *A. angustifolia* and their antibacterial, anti-inflammatory, antiulcerogenic, and molluscicidal activity has been evaluated (López-Salazar *et al.*, 2019; Camacho-Campos *et al.*, 2020). There are no previous reports on the antifungal activity of *A. cupreata* and *A. angustifolia*. Thus, the present study aimed: 1) to determine the phytochemical profile of *A. angustifolia* and *A. cupreata*, and 2) to evaluate the antifungal effect of the extracts of these two botanical species on the mycelial growth and spore production of five phytopathogenic fungi of agricultural importance.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** Leaves of *A. angustifolia* and *A. cupreata* were collected in the state of Guerrero, Mex., in the towns of Coacán, municipality of Atenango del Río (Latitude: 18.139444, Longitude: -49.187778) and in Totomochapa municipality of Tlapa de Comonfort, Guerrero (Latitude: 17.541111, Longitude: -98.459167) respectively. The identification of *A. cupreata* and *A. angustifolia* was carried out by Dr. Abisai J. García Mendoza of the National Herbarium of Mexico (MEXU). The assigned accession numbers were: MEXU-2050 for *Agave cupreata* and ARC for *Agave angustifolia*.

**Obtaining extracts from *Agave* spp.** The collected leaves were cleaned with water. With the help of a knife, they were then cut into fractions of an approximate size of 3 cm. The aqueous extract

génica y molusquicida (López-Salazar *et al.*, 2019; Camacho-Campos *et al.*, 2020). Para las especies de *A. cupreata* y *A. angustifolia* no existen reportes previos sobre su actividad antifúngica, por lo que los objetivos de este trabajo fueron: 1) conocer el perfil fitoquímico de *A. angustifolia* y *A. cupreata*, y 2) evaluar el efecto antifúngico en el crecimiento micelial y producción de esporas de los extractos de estas dos especies botánicas, contra cinco hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Las hojas de *A. angustifolia* y *A. cupreata* se recolectaron en Guerrero, México, en las localidades de Coacán, municipio de Atenango del Río (Latitud: 18.139444, Longitud: -49.187778) y en Totomochapa municipio de Tlapa de Comonfort, Guerrero (Latitud: 17.541111, Longitud: -98.459167) respectivamente. La identificación de *A. cupreata* y *A. angustifolia* la realizó el Dr. Abisai J. García Mendoza del Herbario Nacional de México (MEXU). Los números de acceso asignados fueron: MEXU-2050 para *Agave cupreata* y ARC para *Agave angustifolia*.

**Obtención de extractos de *Agave* spp.** Las hojas se sometieron a un proceso de limpieza con agua, posteriormente se cortaron en fracciones con ayuda de un cuchillo a un tamaño aproximado de 3 cm. La obtención del extracto acuoso de *A. angustifolia* (EAAa) se realizó mediante la incorporación del material vegetal (300 g) con agua a 60 °C y se dejó reposar durante 3 h, transcurrido este tiempo se filtró y el extracto acuoso obtenido se congeló a -40 °C hasta realizar el proceso de liofilización en un equipo Free Zone 4.5 L (Labconco, Kansas, EE. UU.) a vacío de 0.045 mBar y temperatura de -52 °C. El polvo obtenido se almacenó a -20 °C hasta su

of *A. angustifolia* (EAAa) was obtained by mixing the plant material (300 g) with water at 60 °C and leaving it to stand for 3 h. The mixture was then filtered and the obtained aqueous extract was frozen at -40 °C until lyophilization, which was carried out in a Free Zone 4.5 L system (Labconco, Kansas, USA) at a vacuum of 0.045 mBar and a temperature of -52 °C. The obtained powder was stored at -20 °C for later use in the antifungal activity test. The acetone extract of *A. cupreata* (EAAc) was obtained by direct maceration of the leaves (3500 g) with acetone (Golden Bell, Mexico) for 48 h. It was then filtered and the organic phase was evaporated in a rotary evaporator (digital rotary 410, Puebla, Mexico) at 80 rpm and 60 °C. Once the extract was obtained, it was stored at room temperature in amber bottles protected from light. The yield percentage of the extracts was calculated using the following formula:

$$\text{Yield percentage} = \frac{\text{Extract obtained (g)} \times 100}{\text{Macerated plant material (g)}}$$

**Qualitative phytochemical Profile.** The phytochemical profile was determined using thin-layer chromatography, as proposed by Salazar-Pineda *et al.* (2017). The extracts (5 mg) were diluted in 1 mL of extraction solvent and placed, using a capillary tube, on chromatoplates with silica gel TLC-F<sub>254</sub> (5 cm high x 5 cm wide; Merck) that were eluted with hexane-acetone (7:3). The chromatoplates were observed under UV light (254 nm) and sprayed with the following chemical developers: Dragendorff (alkaloids), Polyethylene glycol (flavonoids), Liebermann-Burchard (triterpenes and saponins), and vanillin-phosphoric acid (terpenes, lignans, and curcubitacins) for the qualitative identification of secondary metabolites.

**Phytopathogenic fungi and preparation of colonies.** The fungi used were obtained from the

uso en la prueba de actividad antifúngica. El extracto acetónico de *A. cupreata* (EAAc) se obtuvo por maceración directa de las hojas (3500 g) con acetona (Golden Bell, México) durante 48 h, posteriormente se filtró y la fase orgánica se evaporó en un rota-evaporador (digital rotary 410, Puebla, México) a 80 rpm y 60 °C, una vez obtenido el extracto, se almacenó a temperatura ambiente en frascos ámbar protegidos de la luz. El porcentaje de rendimiento de los extractos se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Extracto obtenido (g)} \times 100}{\text{Material vegetal macerado (g)}}$$

**Perfil fitoquímico cualitativo.** Para determinar el perfil fitoquímico se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina, propuesta por Salazar-Pineda *et al.* (2017). Los extractos (5 mg) se diluyeron en 1 mL de disolvente de extracción y se colocaron con un capilar sobre cromatoplasmas de silica gel TLC-F<sub>254</sub> (5 cm de altura x 5 cm de ancho; Merck) que se eluyeron con el sistema 7:3 hexano-acetona. Finalmente, las cromatoplasmas se observaron en luz UV (254 nm) y se trataron con los siguientes reveladores químicos: Dragendorff (alcaloides), Polietilenglicol (flavonoides), Liebermann-Burchard (triterpenos y saponinas) y vainillina-ácido fosfórico (terpenos, lignanos y curcubitacinas) para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios.

**Hongos fitopatógenos y preparación de colonias.**

Los hongos utilizados fueron proporcionados de la colección del Laboratorio de Enfermedades de Frutales del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, con sede en Motecillo, Texcoco, México. Las especies utilizadas en los ensayos fueron: *E. sorghinum*, *Fusarium subglutinans*, *Lasiodiplodia viticola*, *L. iraniensis* y *Colletotrichum* sp., todas fueron patógenas en sus hospedantes primarios. Colonias de cada especie fungosa,

collection of the Laboratory of Fruit Diseases of the Phytopathology Program of the Colegio de Postgraduados, based in Motecillo, Texcoco, Mexico. The species used in the assays were: *E. sorghinum*, *Fusarium subglutinans*, *Lasiodiplodia viticola*, *L. iraniensis*, and *Colletotrichum* sp., all of which were pathogenic for their primary hosts. Colonies of each fungal species were used for *in vitro* tests. The colonies were obtained from monosporic isolates and incubated for 72 h in Petri dishes with PDA medium (Potato Dextrose Agar 5%, Bioxon, Mexico).

#### **Effect of *Agave* spp. extracts on mycelial growth.**

The agar dilution technique was used (González-Alvarez *et al.*, 2015), with some modifications. The EAAc and EAAa extracts were dissolved in sterile water to concentrations of 2-16 mg mL<sup>-1</sup> and placed in sterile Petri dishes (60 x 15 mm) containing 3 mL of unsolidified PDA agar. Once the agar gelled, a PDA disk with mycelial growth (5 mm in diameter) was placed in the center of the Petri dishes for each experimental fungal species. The dishes were incubated at 25 °C and the diameter of mycelial growth was monitored at 24, 48 and 72 h until the negative control colony (PDA medium plus fungi without extracts) covered the surface of the Petri dish completely. The antifungal Mancozeb (Manzate®) was used as a positive control at a concentration of 16 mg mL<sup>-1</sup>. All tests were performed in triplicate. The percentage of mycelial growth inhibition was determined at 72 h and was estimated using the following formula:

$$\% \text{ of inhibition} = (1 - (D2 / D1)) * 100$$

Where D1 is the average value of the diameter of the negative control colony and D2 is the average value of the diameter of the colony inhibited by the extracts.

obtenidas a partir de aislamientos monospóricos e incubadas durante 72 h en cajas Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar 5%, Bioxon, México) se utilizaron para las pruebas *in vitro*.

**Efecto de extractos de *Agave* spp., sobre el crecimiento micelial.** Se utilizó técnica de dilución en agar (González-Alvarez *et al.*, 2015) con algunas modificaciones. Los extractos EAAc y EAAa se disolvieron en agua estéril y se adicionaron a concentraciones de 2-16 mg mL<sup>-1</sup> en cajas de Petri (60 x 15 mm) estériles que contenían 3 mL de agar PDA sin solidificar. Una vez que el agar se gelificó en el centro de las cajas Petri se colocó un disco de PDA con crecimiento micelial (5 mm de diámetro) por especie fungosa experimental. Las cajas se incubaron a 25 °C y se monitoreó el diámetro del crecimiento micelial a las 24, 48 y 72 h hasta que la colonia del control negativo (medio PDA más hongos sin extractos) cubrió completamente la superficie de la caja de Petri. Se utilizó como control positivo el antifúngico Mancozeb (Manzate®) a 16 mg mL<sup>-1</sup>. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se determinó a las 72 h y se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - (D2 / D1)) * 100$$

Donde D1 valor promedio del diámetro de la colonia del control negativo y D2 valor promedio del diámetro de la colonia inhibida por los extractos.

**Efecto de los extractos de *Agave* spp., sobre la producción de esporas.** Para determinar el efecto de los extractos EAAc y EAAa sobre la esporulación a las 72 h de crecimiento, se usaron las mismas cajas donde se determinó la actividad antifúngica a la concentración de 16 mg mL<sup>-1</sup>. El micelio de las cajas se asperjó con agua destilada estéril (5 mL)

### **Effect of *Agave* spp. extracts on spore production.**

The effect of the EAAc and EAAa extracts on sporulation at 72 h of growth was determined in the same Petri dishes that were used to determine antifungal activity at a concentration of 16 mg mL<sup>-1</sup>. The mycelium in the dishes was sprinkled with sterile distilled water (5 mL) and scraped with a bacteriological loop. The obtained suspension was filtered through a Pasteur pipette containing cotton as a filter (sterile) to remove fragments of culture medium and mycelium. Subsequently, 20 µL of the filtered suspension were placed in a Neubauer chamber. The spores were counted with the help of an optical microscope (10x; Olympus). The spore concentration was expressed in spores mL<sup>-1</sup>. All experiments were performed in triplicate.

**Statistical analysis.** The results were expressed as the mean of three repetitions ± standard deviation. Mycelial growth inhibition was assessed using an analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test. The inhibition of spore production was assessed using Dunnett's test with the negative control used for comparison. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The statistical package Sigma Plot version 11.0 was used for all analyses.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

**Phytochemical profile.** The amount of extract obtained for EAAc was 20 g (0.57%) and 2.8 g (0.93%) for EAAa. Different phytochemical compounds were identified in the EAAc and EAAa extracts (Table 1). The variability is mainly due to the polarity of the solvent used in the extraction since the extractability of the compounds depends on their nature and solubility (Bui *et al.*, 2021). The flavonoids present in the EAAa are generally

and were scraped with a bacteriological loop, the suspension obtained was filtered in a Pasteur pipette that contained cotton as a filter (sterile) to eliminate fragments of culture medium and mycelium. Subsequently, from the filtered suspension 20 µL were placed in a Neubauer chamber and with the help of an optical microscope (10x; Olympus) the spores were counted and the concentration expressed in spores mL<sup>-1</sup>. All experiments were performed in triplicate.

**Análisis estadístico.** Los resultados se expresaron como el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Para la actividad de inhibición del crecimiento micelial se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey y para la actividad de inhibición en la producción de esporas se realizó una prueba de Dunnett con respecto al control negativo. Se utilizó el paquete estadístico Sigma Plot version 11.0. Se consideró diferencia estadística significativa con un valor de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Perfil fitoquímico.** La cantidad de extracto obtenido para el EAAc fue de 20 g (0.57 %) y 2.8 g (0.93%) para el EAAa. Se determinó que los extractos EAAc y EAAa presentaron diferentes compuestos fitoquímicos (Cuadro 1). La variabilidad se debe principalmente a la polaridad del disolvente utilizado en la extracción, ya que la extractabilidad de estos depende de su naturaleza y solubilidad (Bui *et al.*, 2021). En este sentido, los flavonoides que se presentaron en el EAAa generalmente son extraídos con disolventes altamente polares como el agua, mientras que los alcaloides detectados en el EAAc son insolubles o poco solubles en agua, por lo que se extraen con otros disolventes orgánicos como etanol, metanol, acetona y cloroformo. Aunque

**Table 1. Qualitative phytochemical profile of the aqueous and acetone extracts of *Agave angustifolia* and *Agave cupreata*.****Cuadro 1. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos acuoso y acetónico de *Agave angustifolia* y *Agave cupreata*.**

| Revelador                  | Metabolito identificado            | Disolvente        |                   |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                            |                                    | EAAa <sup>y</sup> | EAAc <sup>z</sup> |
| Dragendorff                | Alcaloides                         | -                 | +                 |
| Polietilenglicol           | Flavonoides                        | +                 | -                 |
| Liebermann-Burchard        | Triterpenos, Saponinas             | +                 | +                 |
| Vainillina ácido fosfórico | Terpenos, Lignanos, Curcubitacinas | -                 | -                 |

<sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia*, <sup>z</sup>EAAc: extracto de acetona de *Agave cupreata*; +: Presencia, - Ausencia. / <sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia*, <sup>z</sup>EAAc: extracto de acetona de *Agave cupreata*; +: Presencia, - Ausencia.

extracted using highly polar solvents such as water, while the alkaloids detected in the EAAc are insoluble or slightly soluble in water, so they are extracted with other organic solvents such as ethanol, methanol, acetone, and chloroform. The presence or absence of certain compounds is also due to the biotic or abiotic factors to which the plants have been subjected (Pavarini *et al.*, 2012). The saponins detected in *A. cupreata* have already been reported by Salazar-Pineda *et al.* (2017) and Urbina *et al.* (2018). Steroidal saponins have also been identified in methanolic extracts of the leaves of *A. angustifolia* (Pereira *et al.*, 2017). Some authors have pointed out that these compounds are very common in the genus and yucagenin, hecogenin, tigogenin, diosgenin, ruizgenin and chlorogenin have been identified in species such as: *A. lechuguilla*, *A. americana*, *A. inaequidens*, *A. hookeri*, *A. fourcroydes*, *A. brittoniana*, and *A. macroacantha* (López-Salazar *et al.*, 2019; González-Madariaga *et al.*, 2020). With respect to triterpenes, Ahumada-Santos *et al.* (2013) reported the presence of p-cymene, limonene,  $\beta$ -trans ocimene, linalool,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol and trans-nerolidol in extracts of *A. angustifolia*. Salazar-Pineda *et al.* (2017) reported the qualitative presence of triterpenes in extracts of the leaves of *A.*

también la presencia o ausencia de compuestos se debe a los factores bióticos o abióticos a los que se han sometido las plantas (Pavarini *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, las saponinas detectadas en *A. cupreata* ya han sido reportadas por Salazar-Pineda *et al.* (2017) y Urbina *et al.* (2018); mientras que, para *A. angustifolia* se han identificado saponinas esteroidales en extractos metanólicos de hojas (Pereira *et al.*, 2017). Algunos autores señalaron que estos compuestos son muy comunes en el género y se han identificado yucagenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, ruizgenina y clorogenina en *Agaves* como: *A. lechuguilla*, *A. americana*, *A. inaequidens*, *A. hookeri*, *A. fourcroydes*, *A. brittoniana* y *A. macroacantha* (López-Salazar *et al.*, 2019; González-Madariaga *et al.*, 2020). En cuanto a los triterpenos, Ahumada-Santos *et al.* (2013) reportaron la presencia de p-cymeno, limoneno,  $\beta$ -trans ocimeno, linalool,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol y trans-nerolidol en extractos de *A. angustifolia*, mientras, Salazar-Pineda *et al.* (2017) señalan la presencia cualitativa de triterpenos en los extractos de las hojas de *A. cupreata*. También se ha detectado la presencia de  $\alpha$ -linalol,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, geraniol, nerol,  $\alpha$ -cubebeno, cadineno y trans-nerolidol entre otros, en extractos de *Agave salmiana*, *Agave tequilana* y *Agave potatorum* (Soto-Castro *et al.*,

*cupreata*. The presence of  $\alpha$ -linalool,  $\alpha$ -terpinene, limonene, geraniol, nerol,  $\alpha$ -cubebene, cadinene and trans-nerolidol, among others, has also been detected in extracts of *Agave salmiana*, *Agave tequilana*, and *Agave potatorum* (Soto-Castro *et al.*, 2021). Regarding flavonoids, Ahumada-Santos *et al.* (2013) mentioned that the concentration of flavonoids in *A. angustifolia* was low. Kaempferol, myricetin rhamnoside, and quercetin arabinoside have been identified in the methanolic extracts of the leaves of *Agave attenuata* and qualitatively in *A. potatorum* (Soto-Castro *et al.*, 2021).

#### **Effect of *Agave* spp. extracts on mycelial growth.**

The obtained extracts showed different effects on the mycelial growth of the fungi under study (Figure 1). In general, the application of these extracts was associated with a decrease in colony growth (Figure 1 A2-E2), presence of aerial mycelium (Figure 1 B2 and 3; D2 and 3), cottony (Figure 1 A5, C5, D5, E5) and deformed (Figure 1 A2, A5, C5, E5), as well as pigment production (Figure 1 A2, A3, A4, C5 and D3). The colonies in the negative control grew with normal shape, size and texture (Figure 1 A1-E1).

Even though no previous studies exist on the negative effect of *A. angustifolia* and *A. cupreata* on the morphology of the fungi under study, Siddhapura *et al.* (2011) mentioned that the methanolic extracts of *Agave ferox*, *A. marginata*, *A. americana*, *A. montana* and *A. scabra* affected the development of *Postia placenta*. The observed effects on the morphology, texture, vertical expansion of the mycelium, dehydration and pigment production have already been reported (De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2020). However, it is important to indicate that the mechanism by which they are produced is related to the action of metabolites associated with the cell wall. For example, the essential oils of *Lavandula angustifolia* and *Eucalyptus globulus* induced the formation of rough folds, torsion,

2021). Para los flavonoides, Ahumada-Santos *et al.* (2013) mencionaron que la cantidad de flavonoides en *A. angustifolia* fue baja. El kaempferol, ramnosido de myrcetina y arabinosido de quercetina se han identificado en los extractos metanólicos de las hojas de *Agave attenuata* y de manera cualitativa en *A. potatorum* (Soto-Castro *et al.*, 2021).

#### **Efecto de extractos de *Agave* spp., sobre el crecimiento micelial.**

Los extractos presentaron efectos diferentes sobre el crecimiento micelial de los hongos (Figura 1). En general, se observó disminución del crecimiento de la colonia (Figura 1 A2-E2), presencia de micelio aéreo (Figura 1 B 2 y 3; D 2 y 3), algodonoso (Figura 1 A5, C5, D5, E5) y deforme (Figura 1 A2, A5, C5, E5) y la producción de pigmentos (Figura 1 A2, A3, A4, C5 y D3). Así mismo, se determinó que las colonias correspondientes al control negativo se desarrollaron con forma, tamaño y textura normales (Figura 1 A1-E1).

Aunque no se han realizado estudios relacionados con el efecto de negativo de *A. angustifolia* y *A. cupreata* sobre la morfología de los hongos que se evaluaron, Siddhapura *et al.* (2011) mencionaron que los extractos metanólicos de *Agave ferox*, *A. marginata*, *A. americana*, *A. montana* y *A. scabra* tuvieron un efecto sobre el desarrollo de *Postia placenta*. Los efectos observados en el cambio de morfología, textura, expansión vertical del micelio, deshidratación y producción de pigmentos ya han sido reportados (De la Cruz- Ricardez *et al.*, 2020). Sin embargo, es importante indicar que el mecanismo por el cual se producen está relacionado con la acción de los metabolitos con la pared celular. Por ejemplo, los aceites esenciales de *Lavandula angustifolia* y *Eucalyptus globulus* indujeron la formación de pliegues rugosos, torsión, descamación, fracturas y deshidratación de las hifas de *Monilia fructicola* y *Rhizopus stolonifer* (da Silva *et al.*, 2020; De la Cruz- Ricardez *et al.*, 2020).

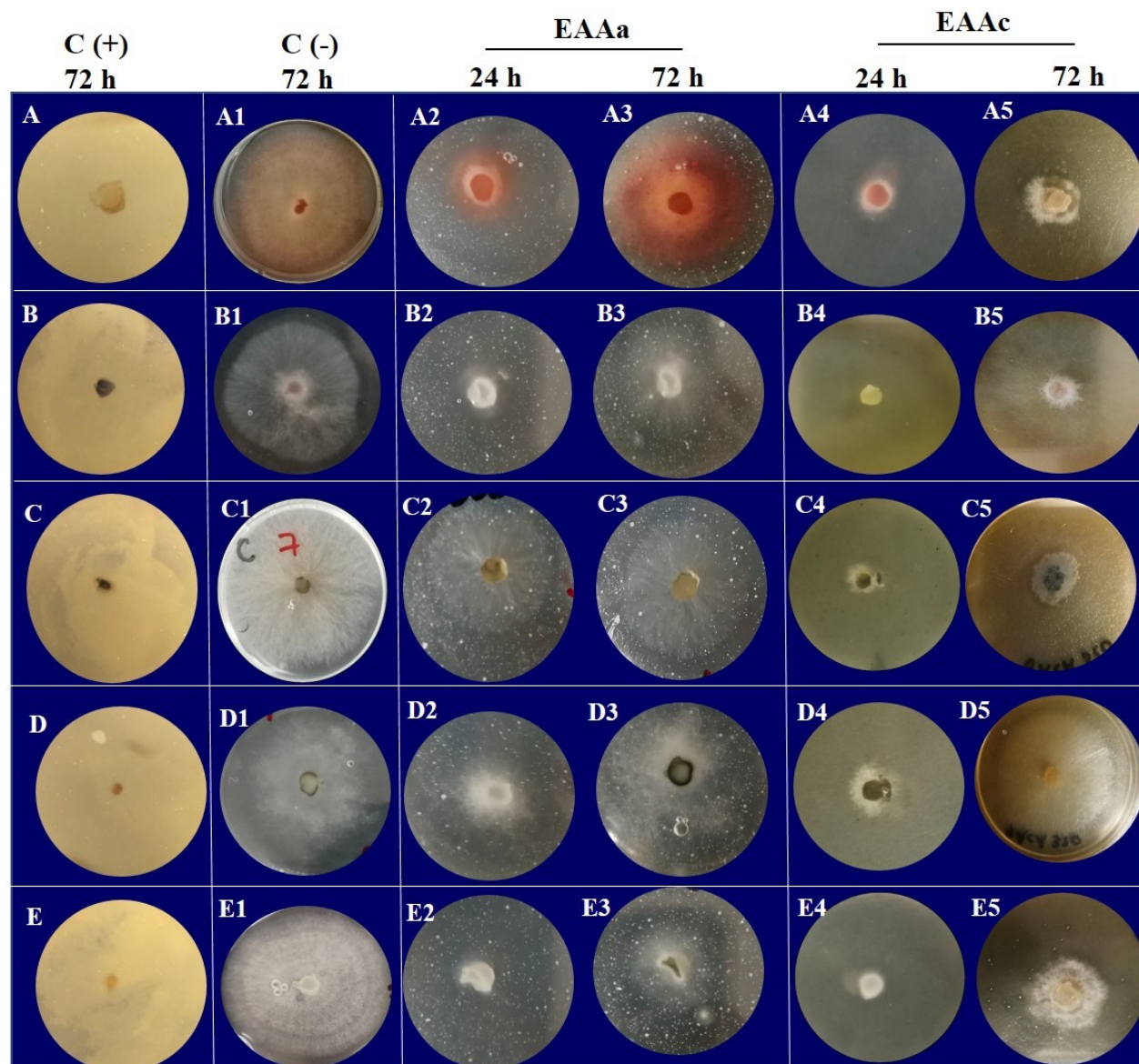


Figure 1. Effect of the aqueous extract from the leaves of *A. angustifolia* (EAAa) and the acetone extract of *A. cupreata* (EAAc) on the growth of five phytopathogenic fungi incubated in 5% PDA for 24 and 72 hours of exposure. A) *E. sorghinum*; B) *F. subglutinans*; C) *L. viticola*; D) *L. iraniensis*; E) *Colletotrichum* sp. C (+): antifungal Mancozeb (Manzate®) at 16 mg mL<sup>-1</sup>; C(-): 5% PDA agar.

Figura 1. Efecto del extracto acuoso de hoja de *A. angustifolia* (EAAa) y del extracto de acetona de *A. cupreata* (EAAc) sobre el crecimiento de cinco hongos fitopatógenos incubados en PDA 5% durante 24 y 72 h de exposición. A) *E. sorghinum*; B) *F. subglutinans*; C) *L. viticola*; D) *L. iraniensis*; E) *Colletotrichum* sp. C (+): antifúngico Mancozeb (Manzate®) a 16 mg mL<sup>-1</sup>; C(-): agar PDA 5%.

peeling, fractures, and dehydration of the hyphae of *Monilinia fructicola* and *Rhizopus stolonifer* (da Silva *et al.*, 2020; De la Cruz- Ricardez *et al.*, 2020).

El efecto antifúngico de los EAAa y EAAc a diferentes concentraciones contra los hongos fitopatógenos se muestra en el Cuadro 2. La inhibición del crecimiento micelial del EAAc (39-

Table 2 shows the antifungal effect of different concentrations of EAAa and EAAc against phytopathogenic fungi. The inhibition of mycelial growth of EAAc (39-76%) was significantly different ( $p \leq 0.05$ ) compared to that of EAAa (20-40%). The table shows that the species *L. viticola*, *E. sorghinum* and *Colletotrichum* sp. were sensitive to EAAc, with mycelial growth inhibition percentages between 38 and 76% at concentrations of 16 and 8 mg mL<sup>-1</sup> ( $p \leq 0.001$ ).

In the case of EAAa, the percentages of mycelial growth inhibition in *E. sorghinum* and *Colletotrichum* sp. did not show statistically significant differences ( $p \geq 0.064$ ) at concentrations of 4-16 mg mL<sup>-1</sup>. However, this extract was the only one that showed inhibitory activity against *F. subglutinans*, at 16 mg mL<sup>-1</sup>. Exposure to EAAa had no effect on *L. viticola* and *L. iraniensis*.

The results obtained demonstrate for the first time the antifungal activity of the polar extracts

76%) presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con el EAAa (20-40%). Del cuadro se desprende que las especies *L. viticola*, *E. sorghinum* y *Colletotrichum* sp. fueron sensibles al EAAc, determinándose porcentajes de inhibición del crecimiento micelial entre 38-76% a concentraciones de 16 y 8 mg mL<sup>-1</sup> ( $p \leq 0.001$ ).

Para el EAAa los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial en las concentraciones de 4-16 mg mL<sup>-1</sup> sobre *E. sorghinum* y *Colletotrichum* sp., no presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p \geq 0.064$ ) para estas especies. Mientras que este extracto fue el único que presentó actividad contra *F. subglutinans* a 16 mg mL<sup>-1</sup>. Adicionalmente, la exposición a EAAa no tuvo efecto en *L. viticola* y *L. iraniensis*.

Los resultados obtenidos documentan por primera vez la actividad antifúngica de los extractos polares EAAa y EAAc sobre hongos fitopatógenos de interés económico. Sin embargo, otros autores

**Table 2. Inhibition percentage of mycelial growth of five phytopathogenic fungi exposed to aqueous and acetic extracts from the leaves of *A. angustifolia* and *A. cupreata*.**  
**Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de cinco hongos fitopatógenos expuestos a los extractos acuoso y acético de hojas de *A. angustifolia* y *A. cupreata*.**

| Extracto               | Concentración (mg mL <sup>-1</sup> ) | % de inhibición del crecimiento micelial |                              |                               |                                 |                           |
|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
|                        |                                      | <i>Epicoccum sorghinum</i>               | <i>Fusarium subglutinans</i> | <i>Lasiodiplodia viticola</i> | <i>Lasiodiplodia iraniensis</i> | <i>Colletotrichum</i> sp. |
| EAAa <sup>y</sup>      | 2                                    | ---                                      | ---                          | ---                           | ---                             | ---                       |
|                        | 4                                    | 39.4b                                    | ---                          | ---                           | ---                             | ---                       |
|                        | 8                                    | 39.4b                                    | ---                          | ---                           | ---                             | ---                       |
|                        | 16                                   | 40.0b                                    | 20.0a                        | ---                           | ---                             | 41.6b                     |
| EAAc <sup>z</sup>      | 2                                    | ---                                      | ---                          | 17.3b                         | ---                             | ---                       |
|                        | 4                                    | 13.3c                                    | ---                          | 16.6b                         | ---                             | 32.0c                     |
|                        | 8                                    | 39.4b                                    | ---                          | 74.0a                         | 12.0b                           | 38.0b                     |
|                        | 16                                   | 59.6a                                    | ---                          | 76.6a                         | 17.8a                           | 60.8a                     |
| Control (+)<br>Manzate | 16                                   | 100                                      | 100                          | 100                           | 100                             | 100                       |

<sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia* acuoso, <sup>z</sup>EAAc: extracto de acetona de *Agave cupreata*; ---: No Presentó inhibición del crecimiento micelial. Medias con letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). / <sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia* acuoso, <sup>z</sup>EAAc: extracto de acetona de *Agave cupreata*; ---: No Presentó inhibición del crecimiento micelial. Medias con letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).



EAAa and EAAC on phytopathogenic fungi of economic interest. However, other authors have indicated the antifungal potential of polar extracts obtained from different species of *Agave* (*A. montana*, *A. americana*, *A. marginetta*, *A. lechuguilla*, *A. scabra* and *A. ferox*) against *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. udum*, and *Colletotrichum gloeosporioides*, reporting mycelial growth inhibition percentages ranging from 15 to 100% (De Rodríguez *et al.*, 2011; Maharshi and Thaker, 2014; González-Alvarez *et al.*, 2015).

The results of the present study show variability in the phytochemical profile (Table 1) and mycelial growth inhibition activity (Table 2) of the *Agave* extracts under study when used on phytopathogenic fungi. The biological effect of each compound on different microorganisms has been reported before. Lagrouh *et al.* (2017) mentioned the antifungal effect of alkaloids and attributed to them the ability to intercalate with DNA, stop protein synthesis, induce apoptosis, and inhibit carbohydrate metabolism enzymes. Zhao *et al.* (2021) indicated that the alkaloid lycorine damages the integrity of cell membranes, reduces cell viability and affects the expression of GTPase BcMPS1, Bccdc, BcRac and BcRas1 in *B. cinerea*. Furthermore, flavonoids have been reported to have antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* through their effect on protein precipitation and the formation of complexes with the nucleophilic amino acids of proteins, which inactivates them and causes developmental arrest. In contrast, the effect of flavonoids on *B. cinerea* is attributed to the inhibition of fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase (Jin, 2019; Tapia-Quirós *et al.*, 2020). In *R. solani*, terpene compounds affect the permeability of the pathogen's membrane, causing metabolic disorders and inhibiting mycelial growth. They also disrupt the potential of the mitochondrial membrane (causing loss of structure and function),

sustentan el potencial antifúngico de extractos polares obtenidos de diferentes especies de *Agaves* (*A. montana*, *A. americana*, *A. marginetta*, *A. lechuguilla*, *A. scabra* y *A. ferox*) contra *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. udum* y *Colletotrichum gloeosporioides* determinando porcentajes de inhibición del crecimiento micelial en rangos de 15-100% (De Rodríguez *et al.*, 2011; Maharshi y Thaker, 2014; González-Alvarez *et al.*, 2015).

Los resultados de este estudio demuestran que los extractos de *Agave* presentan una variabilidad tanto en su perfil fitoquímico (Cuadro 1) como en su actividad de inhibición del crecimiento micelial sobre hongos fitopatógenos (Cuadro 2). El efecto biológico que ejerce cada compuesto sobre distintos microorganismos ha sido reportado. Lagrouh *et al.* (2017) mencionaron el efecto antifúngico de los alcaloides y les atribuyeron la capacidad de intercalarse con el ADN, detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos. Mientras que Zhao *et al.* (2021), mencionaron que el alcaloide licorina daña la integridad de la membrana celular, disminuye la viabilidad y tiene un efecto sobre la expresión de GTPasa BcMPS1, Bccdc, BcRac y BcRas1 en *B. cinerea*. Asimismo, los mecanismos de acción antifúngicos para los flavonoides se han reportado en *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* y se han relacionado con la precipitación de proteínas y la formación de complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas inactivándolas y provocando la detención del desarrollo. En contraste, en *B. cinerea* su efecto se atribuye a la inhibición de la endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngica (Jin, 2019; Tapia-Quirós *et al.*, 2020). Por su parte, en *R. solani*, los compuestos terpénicos afectan la permeabilidad de la membrana del patógeno, provocando trastornos metabólicos e inhibiendo el crecimiento micelial, también disrumpen el potencial de la membrana mitocondrial (provocando pérdida de estructura y

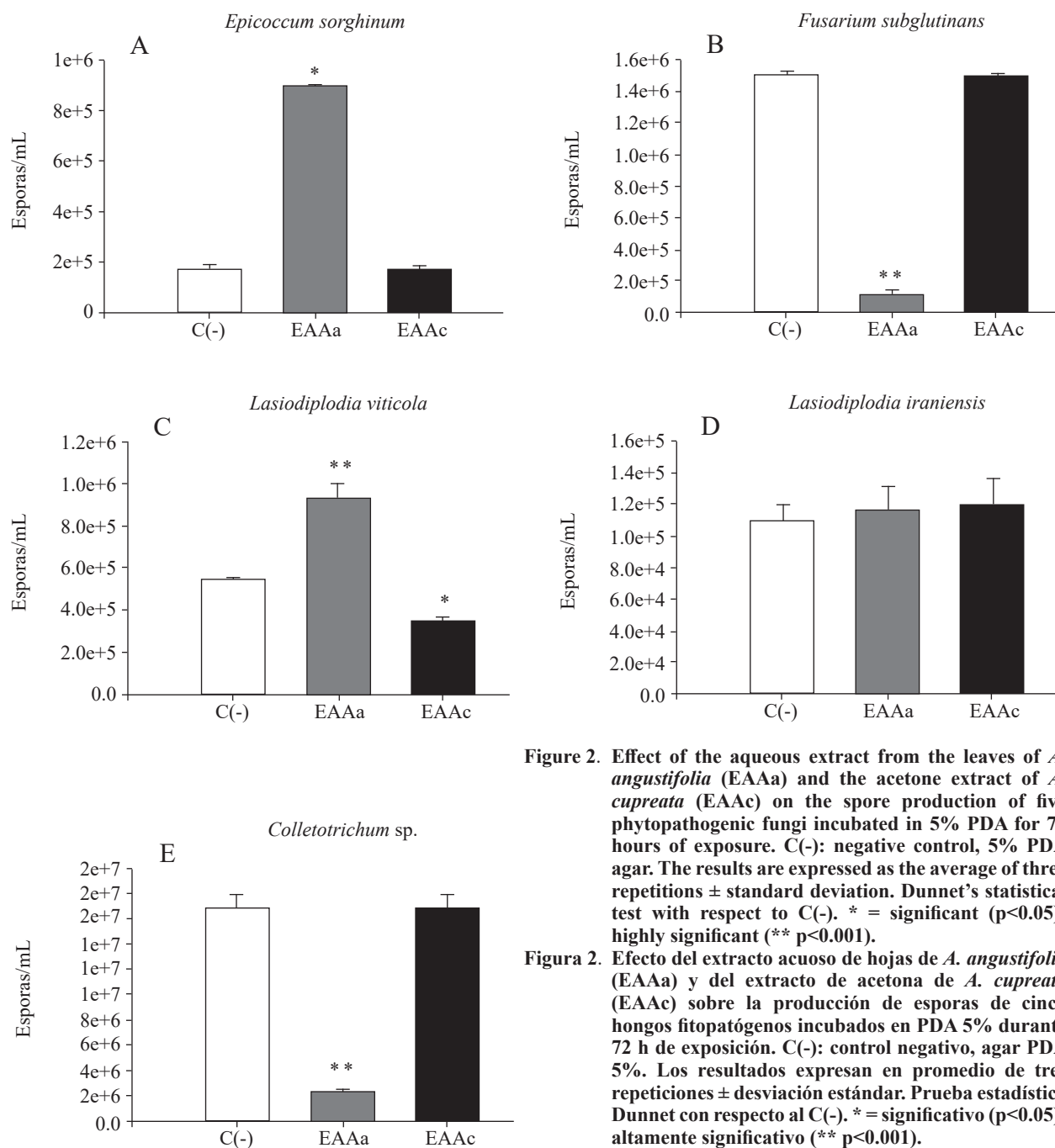
inhibit the cycle of tricarboxylic acids, reduce ATP content and inhibit ATPase (Yan *et al.*, 2020). Regarding saponins, it has been determined that these compounds form complexes with sterols in the cell membranes, causing them to disintegrate through the formation of pores and the triggering of cell lysis (Zaynab *et al.*, 2021). Ito *et al.* (2007) mentioned that  $\alpha$  tomatine induces apoptosis mediated by the accumulation of reactive oxygen species in *F. oxysporum*.

**Effect of *Agave* spp. extracts on spore production.** Figure 2 shows the effect of the extracts under study on the production of spores of each of the fungal strains tested. The most surprising results were obtained with the EAAa extract, which showed 40% inhibition of mycelial growth against *F. subglutinans* and *Colletotrichum* sp. However, spore production decreased by 92 and 86.6% compared to the negative control, respectively (Figure 2 B and E). This result is relevant for the control of these phytopathogens because it would prevent their reproduction and dissemination. On the contrary, EAAa stimulated the production of the spores of *E. sorghinum* and *L. viticola* (Figure 2 A and C), causing an increase of 407.5 and 73.2%, respectively, compared to the negative control ( $p \leq 0.001$ ). No effect was observed on the production of spores *L. iraniensis* (Figure 2D). Regarding the EAAC extract, which showed a greater inhibiting effect on the mycelial growth of *L. viticola*, *E. sorghinum* and *Colletotrichum* sp. (Table 2), caused a decrease of only 35.6% in the production of spores of *L. viticola* (Figure 2C), compared to the negative control ( $p \leq 0.001$ ), while no effects were observed on the spore production of *E. sorghinum*, *F. subglutinans*, *L. iraniensis* and *Colletotrichum* sp. (Figure 2 A, B, D and E), compared to the negative control ( $p \geq 0.05$ ).

Although the inhibitory effect of extracts from different agaves on the mycelial growth of various

función), inhiben el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, reducen el contenido de ATP e inhiben las ATPas (Yan *et al.*, 2020). En cuanto a las saponinas, se ha determinado que estos compuestos forman complejos con los esteroides en las membranas causando su desintegración debido a la formación de poros y finalmente lisis celular (Zaynab *et al.*, 2021). Por otro lado, Ito *et al.* (2007) mencionaron que la  $\alpha$  tomatina induce apoptosis mediada por acumulación de especies reactivas de oxígeno en *F. oxysporum*.

**Efecto de los extractos de *Agave* spp., sobre la producción de esporas.** El efecto de los extractos sobre la producción de esporas en cada una de las cepas de hongos ensayados se muestra en la Figura 2. Los resultados más sorprendentes se obtuvieron con el extracto de EAAa que presentó 40% inhibición del crecimiento micelial para *F. subglutinans* y *Colletotrichum* sp., sin embargo, se observaron porcentajes de disminución en la producción de esporas de 92 y 86.6% respectivamente con respecto al control negativo (Figura 2 B y E). Este resultado es relevante para el control de estos fitopatógenos porque impediría su reproducción y disseminación. Por el contrario, el EAAa estimuló la producción de esporas de *E. sorghinum* y *L. viticola* (Figura 2 A y C), determinándose un aumento del 407.5 y 73.2% respectivamente en comparación con el control negativo ( $p \leq 0.001$ ). Mientras que para *L. iraniensis* no se observó efecto sobre la disminución de las esporas (Figura 2D). Para el extracto EAAC, que presentó mayor inhibición del crecimiento micelial sobre *L. viticola*, *E. sorghinum* y *Colletotrichum* sp. (Cuadro 2), sólo se observó una disminución del 35.6 % en la producción de esporas de *L. viticola* (Figura 2C), respecto al control negativo ( $p \leq 0.001$ ) y para *E. sorghinum*, *F. subglutinans*, *L. iraniensis* y *Colletotrichum* sp. (Figura 2 A, B, D y E) no se encontraron diferencias en la producción de esporas con respecto al control negativo ( $p \geq 0.05$ ).



**Figure 2.** Effect of the aqueous extract from the leaves of *A. angustifolia* (EAAa) and the acetone extract of *A. cupreata* (EAAc) on the spore production of five phytopathogenic fungi incubated in 5% PDA for 72 hours of exposure. C(-): negative control, 5% PDA agar. The results are expressed as the average of three repetitions  $\pm$  standard deviation. Dunnet's statistical test with respect to C(-). \* = significant ( $p < 0.05$ ); highly significant (\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figura 2.** Efecto del extracto acuoso de hojas de *A. angustifolia* (EAAa) y del extracto de acetona de *A. cupreata* (EAAc) sobre la producción de esporas de cinco hongos fitopatógenos incubados en PDA 5% durante 72 h de exposición. C(-): control negativo, agar PDA 5%. Los resultados expresan en promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Prueba estadística Dunnet con respecto al C(-). \* = significativo ( $p < 0.05$ ); altamente significativo (\*\*  $p < 0.001$ ).

species of fungi has been evaluated before, studies on the inhibition of sporulation are still scarce. Lozano-Muñiz *et al.* (2011) found that the aqueous and methanolic extracts from the leaves and flowers

Aunque se ha evaluado el efecto de extractos de diferentes agaves sobre la inhibición del crecimiento micelial en diversas especies de hongos, los estudios sobre la inhibición de la esporulación son escasos.

of *A. americana*, *A. asperima*, *A. lechuguilla*, *A. tequilana* negatively affected the conidiogenesis of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. They reported that the methanolic extracts of *A. asperima* and *A. americana* caused notable changes in conidiophore morphology, which may affect conidiogenesis. Other authors pointed out that the inhibition or stimulation of spore production are possible responses of fungi when exposed to different extracts. For example, Achimon *et al.* (2020) reported that the essential oils of *Pimenta dioica* and *Curcuma longa* (1000 mg L<sup>-1</sup>) inhibited the mycelial growth of *Fusarium verticillioides* M3125 by 87.2 and 55.5%, respectively, but the percentages of conidia production were 3046.4 and 341% respectively. The authors also reported that oils from *Rosmarinus officinalis* showed little growth inhibitory activity (24%), but inhibited conidia production by 27% compared to the control, which is similar to what was observed in the present study.

## CONCLUSIONS

The phytochemical profile of the extracts of *A. angustifolia* and *A. cupreata* confirmed the presence of alkaloids, flavonoids, saponins and triterpenes. The aqueous extract of *A. cupreata* showed an antifungal effect against *L. viticola*, *Colletotrichum* sp. and *E. sorghinum* inhibiting 76, 60 and 59 % of mycelial growth, respectively, at concentrations of 8 and 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), while spore production decreased by 86% in *Colletotrichum* sp. Therefore, this extract has the potential to be used as an alternative source of new natural antifungal compounds.

The acetone extract of *A. angustifolia* inhibited 40% of the mycelial growth of *E. sorghinum* at 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) without reducing its sporulation (p≥0.05).

En este sentido, Lozano-Muñiz *et al.* (2011), encontraron que los extractos acuosos y metanólicos obtenidos de las hojas y flores de *A. americana*, *A. asperima*, *A. lechuguilla*, *A. tequilana* afectaron negativamente la conidiogénesis de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus* reportando que los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. americana* causaron cambios notables en la morfología de los conidióforos que pueden afectar la conidiogénesis. Otros autores señalaron que la inhibición o estimulación en la producción de esporas son respuestas posibles de los hongos al ser expuestos a diferentes extractos. Por ejemplo, Achimón *et al.* (2020), reportaron que los aceites esenciales de *Pimenta dioica* y *Curcuma longa* (1000 mg L<sup>-1</sup>) inhibieron el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides* M3125 en 87.2 y 55.5% respectivamente, pero al mismo tiempo, los porcentajes de producción de conidios fueron de 3046.4 y 341% respectivamente; también determinaron que los aceites de *Rosmarinus officinalis* presentaron poca actividad de inhibición del crecimiento (24%), pero inhibieron en 27% la producción de conidios con respecto al control, lo anterior es similar a lo observado en este estudio.

## CONCLUSIONES

El perfil fitoquímico de los extractos de *A. angustifolia* y *A. cupreata* confirmó la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y triterpenos.

El extracto acuoso de *A. cupreata* presentó efecto antifúngico contra *L. viticola*, *Colletotrichum* sp. y *E. sorghinum* inhibiendo el 76, 60 y 59 % del crecimiento micelial respectivamente en concentraciones de 8 y 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), mientras que, disminuyó la producción de esporas en un 86% en *Colletotrichum* sp. Por lo que puede ser utilizado como una alternativa para la búsqueda de nuevos antifúngicos naturales.

## ACKNOWLEDGMENTS

To sector project number 263188 SEMARNAT-CONACYT “Caracterización física, química y biológica del maguey sacaturo (*Agave angustifolia* Haw) para su aprovechamiento sustentable en la región comprendida entre los municipios de Chilapa y Huitzucu, Gro. Cuenca del Balsas”.

## LITERATURE CITED

- Achimón F, Brito VD, Pizzolitto RP, Ramirez-Sanchez A, Gomez EA and Zygodlo JA. 2020. Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. Revista Argentina de Microbiología. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.001>
- Ahumada-Santos YP, Montes-Ávila J, Uribe-Beltrán M. de J, Díaz-Camacho SP, López-Angulo G, Vega-Aviña R and Delgado-Vargas F. 2013. Chemical characterization, antioxidant, and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. Industrial Crops and Products 49:143-149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.050>
- Asael RGH, Guevara-Gonzalez RG, de Jesus RGS and Angelica FPA. 2018. Antifungal activity of mexican endemic plants on agricultural phytopathogens: a review. XIV International Engineering Congress (CONIIN), Engineering Congress (CONIIN), 2018 XIV International.1-11. <https://doi.org/10.1109/CONIIN.2018.8489793>
- Barrientos Rivera G, Esparza Ibarra EL, Segura Pacheco HR, Talavera Mendoza O, Sampedro Rosas ML and Hernández Castro E. 2019. Caracterización morfológica de *Agave angustifolia* y su conservación en Guerrero, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(3): 655-668. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1554>
- Bui NT, Pham TLT, Nguyen KT, Le PH and Kim KH. 2021. Effect of extraction solvent on total phenol, flavonoid content, and antioxidant activity of *Avicennia officinalis*. Biointerface Research in Applied Chemistry 12(2): 2678-2690. <https://doi.org/10.33263/BRIAC122.26782690>
- Camacho-Campos C, Pérez-Hernández Y, Valdivia-Ávila A, Rubio-Fontanills and Fuentes-Alfonso L. 2020. Evaluación fitoquímica, antibacteriana y molusquicida de extractos de hojas de *Agave* spp. Revista Cubana de Química 32(3): 390-405. [https://www.researchgate.net/publication/352712851\\_Evaluacion\\_fitoquimica\\_antibacteriana\\_y\\_molusquicida\\_de\\_extractos\\_de\\_hojas\\_de\\_Agave\\_spp/link/619ba7423068c54fa5114323/download](https://www.researchgate.net/publication/352712851_Evaluacion_fitoquimica_antibacteriana_y_molusquicida_de_extractos_de_hojas_de_Agave_spp/link/619ba7423068c54fa5114323/download)
- da Silva, PPM, de Oliveira J, Biazotto A dos M, Parisi MM, da Glória EM and Spoto MHF. 2020. Essential oils from *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. Ex Bailey and *Eucalyptus urograndis* W. Hill ex Maiden associated to carboxymethyl cellulose coating for the control of *Botrytis*

El extracto acetónico de *A. angustifolia* inhibió el 40% del crecimiento micelial de *E. sorghinum* a 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) sin limitar su esporulación (p≥0.05).

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto sectorial clave 263188 SEMARNAT- CONACYT “Caracterización física, química y biológica del maguey sacaturo (*Agave angustifolia* Haw) para su aprovechamiento sustentable en la región comprendida entre los municipios de Chilapa y Huitzucu, Gro. Cuenca del Balsas”.

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

- cinerea* Pers, Fr. and *Rhizopus stolonifer* (Ehrend, Fr) Vuill in strawberries. Industrial Crops and Products 156. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112884>
- De la Cruz-Ricardez D, Ortiz-García CF, Lagunes-Espinoza L del C and Torres de la Cruz, M. 2020. Efecto antifúngico de extractos metanólicos de *Capsicum* spp. en *Moniliophthora roreri*. Agro-Ciencia 54(6): 813-824. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i6.2186>
- De Oliveira FJG, Silva G da C, Cipriano L, Gomes M and Egea MB. 2021. Control of postharvest fungal diseases in fruits using external application of RNAi. Journal of Food Sciences 86 (8): 3341-3348. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15816>
- De Rodríguez DJ, García RR, Castillo FDH, González CNA, Galindo AS, Quintanilla JAV and Zuccolotto LEM. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. Industrial Crops and Products 34(1): 960-966. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.001>
- El-Hawary SS, El-Kammar HA, Farag MA, Saleh DO and El Dine RS. 2020. Metabolomic profiling of five *Agave* leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their anti-inflammatory, immunomodulatory and ulceroprotective activities. Steroids 160: 108648. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108648>
- García-Mendoza AJ. 2007. Los Agaves de México. Ciencias, Universidad Autónoma de México 87: 14-23. <https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf>
- González-Álvarez M, Moreno-Limón S, Salcedo-Martínez S and Pérez-Rodríguez E. 2015. *In vitro* evaluation of antifungal activity of Agave (*Agave scabra* Salm Dyck) extracts against post-harvest mushrooms. Phytón Revista Internacional de Botánica Experimental 84(1):427-434. <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v84n2/v84n2a23.pdf>

- González-Madariaga Y, Mena-Linares Y, Martín-Montegudo D, Valido-Díaz A, Guerra-de-León JO and Nieto-Reyes L. 2020. *In vivo* anti-inflammatory effect of saponin-enriched fraction from *Agave brittoniana* Trel subspecies brachypus. *Ars Pharmaceutica* (Internet) 61(4): 231-237. <https://scielo.isciii.es/pdf/ars/v61n4/2340-9894-ars-61-04-231.pdf>
- Iñiguez-Covarrubias G, Díaz-Teres R, Sanjuan-Dueñas R, Anzaldo-Hernández J and Rowell R. 2001. Utilization of by-products from the tequila industry, part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresource Technology* 77(2): 101-108. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00167-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00167-X)
- Ito S, Ihara T, Tamura H, Tanaka S, Ikeda T, Kajihara H, Dissanayake C, Abdel-Motaal FF and El-Sayed MA. 2007. α -tomatina, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters* 58(17), 3217-3222. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.010>
- Jain A, Sarsaiya S, Wu Q, Lu Y and Shi J. 2019. A review of plants leaf fungal diseases and its environmental speciation. *Bioengineered* 10(1): 409-424. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>
- Jin YS. 2019. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 29(19): 126589. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.07.048>
- Juárez B, Sosa M and López M. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 4*: 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)
- Lagrouh F, Dakka N and Bakri Y. 2017. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal of Mycologie Médicale* 27(3): 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.04.008>
- López-Salazar H, Camacho-Díaz BH, Ávila-Reyes SV, Pérez-García MD, González-Cortázar M, Arenas Ocampo ML and Jiménez-Aparicio AR. 2019. Identification and quantification of β -sitosterol β -D-glucoside of an ethanolic extract obtained by microwave-assisted extraction from *Agave angustifolia* Haw. *Molecules* (Basel, Switzerland) 24(21): 3926. <https://doi.org/10.3390/molecules24213926>
- Lozano-Muñiz S, García S, Heredia N and Castro-Franco R. 2011. Species of *Agave* induces morphological changes in *Aspergillus parasiticus* Speare and *Aspergillus flavus* Link ex Fries. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 9(2): 767-770. <https://www.researchgate.net/publication/215484700>
- Maharshi A and Thaker V. 2014. Antifungal activity of *Agave* species from Gujarat, India. 423-430 Pp. *In: In: Kharwar R, Upadhyay R, Dubey N, Raghuvanshi R* (eds). *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_37
- Mui Yun Wong, Hamid S, Iskandar Shah NA and Ab Razak NH. 2020. Botanical extracts as biofungicides against fungal pathogens of rice. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 43(4): 457-466. <https://doi.org/10.47836/pjtas.43.4.03>
- Nachilima C, Chigeza G, Chibanda M, Mushoriwa H, Diers BD, Murithi HM and Hartman GL. 2020. Evaluation of foliar diseases for soybean entries in the Pan-African trials in Malawi and Zambia. *Plant Diseases* 104(8): 2068-2073. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2617-SR>
- Ortiz-Martínez EL, Robles-Yerena L, Leyva-Mir GS, 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* 4(1):1-17. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-3>
- Palma-Guerrero J, Chancellor T, Spong J, Canning G, Hammond J, McMillan VE and Hammond-Kosack KE. 2021. Take-all diseases: New insights into an important wheat root pathogen. *Trends in Plant Science* 26 (8): 836-848. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.009>
- Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M and Lopes N. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolites levels. *Animal Feed Science and Technology* 176 (1-4): 5-16. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002>
- Pereira GM, Ribeiro MG, da Silva BP and Parente JP. 2017. Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. Marginata and preliminary investigation of its *in vivo* antiulcerogenic activity and *in vitro* membrane permeability property. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 27 (18): 4345-4349. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.026>
- Salazar-Pineda DT, Castro-Alarcón N, Moreno-Godínez ME, Nicasio-Torres MP, Pérez-Hernández J and Álvarez-Fitz P. 2017. Antibacterial and anti-inflammatory activity of extracts and fractions from *Agave cupreata*. *International Journal of Pharmacology* 13: 1063-1070. <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.1063.1070>
- Siddhapura S, Maharshi A and Thaker V. 2011. Varietal difference in antifungal activity of some species of *Agave*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44(2): 135-141. <https://doi.org/10.1080/03235400902952087>
- Soto-Castro D, Santiago-García PA, Vásquez-López A, Sánchez-Heraz F, Vargas-Mendoza Y and Gaitán-Hernández R. 2021. Effect of ethanolic extracts from *Agave potatorum* Zucc leaves in the mycelial growth of *Pleurotus* spp. *Emirates Journal of Food and Agriculture (EJFA)* 33(3):228-236. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i3.2664>
- Tapia-Quirós P, Martínez-Téllez MA, Ávila-Quezada GD and Vargas-Arispuro I. 2020. Inhibición de endo-1,3- β -glucanasa fúngica por compuestos fenólicos aislados de *Turnera diffusa*: una alternativa para antifúngicos convencionales. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(1):160-169. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-3>
- United Nations. 2019. How certain are the United Nations global population projections?. *Population Facts*. <https://population.un.org/wpp/Publications/>
- Urbina CJF, Casas A, Martínez-Díaz Y, Santos-Zea L and Gutiérrez-Urbe JA. 2018. Domestication and saponin contents in a gradient of management intensity of *Agaves*: *Agave cupreata*, *A. inaequalis* and *A. hookeri* in central

- Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution; An International Journal 65(4):1133. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0601-6>
- Yan YF, Yang CJ, Shang XF, Zhao ZM, Liu YQ, Zhou R, Liu H, Wu TL, Zhao WB, Wang YL, Hu GF, Qin F, He YH, Li HX and Du SS. 2020. Bioassay guided isolation of two antifungal compounds from *Magnolia officinalis* and the mechanism of action of honokiol. Pesticide Biochemistry and Physiology 170. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104705>
- Zaynab M, Sharif Y, Abbas S, Afzal MZ, Qasim M, Khalofah A, Ansari MJ, Khan KA, Tao L and Li S. 2021. Saponin toxicity as key player in plant defense against pathogens. Toxicon 193: 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.01.009>
- Zhao S, Guo Y, Wang Q and An B. 2021. Antifungal effects of lycorina on *Botrytis cinerea* and possible mechanisms. Biotechnology Letters 43(7): 1503-1512. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03128-8>
- Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G, Knäbel A, Payraudeaus S, Rasmussen JJ, Rohr J, Scharmüller A, Smalling K, Sehle S, Schulz R and Schäfer RB. 2019. Fungicides: An overlooked pesticide class?. Environmental Science and Technology 53(7):3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>

Epidemiology of *Bean common mosaic virus* and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes

Epidemiología de *Bean common mosaic virus* y *Alternaria alternata* en 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*

Agustín Gonzalez-Cruces¹, Esly Arista-Carmona¹, Karen Vianey Díaz-Arias¹, Karina Ramírez-Razo¹, Adrián Hernández-Livera¹, Gerardo Acevedo-Sánchez², Coral Mendoza-Ramos², Gustavo Mora-Aguilera^{1,2*}, ¹Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México, Campus Montecillo. ²Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF).

*Corresponding author: morag@colpos.mx

Received: February 28, 2022.

Accepted: April 24, 2022.

Gonzalez-Cruces A, Arista-Carmona E, Díaz-Arias KV, Ramírez-Razo K, Hernández-Livera A, Acevedo-Sánchez G, Mendoza-Ramos C and Mora-Aguilera G. 2022. Epidemiology of *Bean common mosaic virus* and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 188-220.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-8>

Primera publicación DOI: 30 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 30, 2022.

Abstract. Research objective was to assess phytosanitary response and epidemiological behavior in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes and develop etiologic-epidemiological methodologies applicable to plant breeding studies. In 2020 spring-summer season, assessments were conducted at flowering (June) and fructification stages (August). Severity was evaluated with a 6-class logarithmic-diagrammatic scale setup in App-

Resumen. El objetivo de la investigación fue evaluar la respuesta fitosanitaria y comportamiento epidemiológico en 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris* y desarrollar metodologías etiológico-epidemiológicas aplicables a estudios de mejoramiento genético. En ciclo primavera-verano 2020 se realizaron evaluaciones en fases de floración (junio) y fructificación (agosto). La severidad porcentual se evaluó con escala logarítmica-diagramática de 6-clases configurada en App-Monitor[®] v1.1. La sanidad por genotipo se determinó mediante un Índice de Daño Integrado (IDI), ponderando por intensidad de severidad y corregido por vigor de cobertura-planta (IV), calculado con imágenes (RGB, 14mpx) de dron-Phantom-3 a 5 m altura del centroide de genotipo. Se realizaron pruebas de *t*-Student ($p = 0.05$) y ANOVAs, seguido de Tukey ($p = 0.05$), con SAS v9.4 para las distintas variables experimentales. Se analizó la dependencia espacial de contagio con kriging y variogramas omnidireccionales en SURFER v10. Un total de 43

Monitor[®] v1.1. Genotype health was determined using an Integrated Damage Index (IDI), weighted and adjusted for disease severity and coverage-plant vigor (IV), which was estimated with images (RGB, 14mpx) captured with dron-Phantom-3 at 5 m height from genotype centroid. In SAS v9.4, t-test and ANOVAs, followed by Tukey ($p = 0.05$), were performed for different experimental settings. Disease spatial patterns were analyzed with kriging and omnidirectional variograms in SURFER v10. Forty-three total samples were used for isolation, pathogenicity testing, and molecular identification with universal primers ITS1/ITS4, Nib2F/Nib3R, PBL1v2040/PCR1c for eukaryotes, Potyvirus and Begomovirus, respectively. Final data matrix included 22 variables, 859 observations and 18,898 metadata. *Alternaria alternata* and *Bean common mosaic virus* (BCMV) were identified in 100% of samples analyzed with 99% homology. *Vaquita Negro*, *Garrapato* and *Canario* were statistically the most susceptible genotypes (37.3 - 58% severity) for BCMV, while *Canario* and *Tipo Flor de Mayo* (41.4-42.7%) were for *A. alternata* ($p = 0.05$). *Oti* and *Negro Perla* had higher climatic adaptability and tolerance to both pathogens with $IV > 0.7$ and $IDI < 0.43$. Spatially, BCMV presented random dispersion of foci and a block-edge effect with continuous contagion of up to 5.6 meters. *Vaquita Negro* and *Bayo Mecentral* showed uniform virus spread, presumptively due to high viral transmissibility by seed. In contrast, except for *Tipo Flor de Mayo* and *Canario*, which exhibited significant coalescence of foci, *A. alternata* had spatial dependence of less than 8 plants. Wind and hail damage significantly favored *A. alternata* infection ($p = 0.05$) suggesting its opportunistic condition.

Key words: Virus, Fungi, Bean, Geostatistics, Scales, Android application, Severity

muestras se emplearon para aislamiento, pruebas de patogenicidad e identificación genómica con iniciadores universales ITS1/ITS4, Nib2F/Nib3R, PBL1v2040/PCR1c para eucariotes, Potyvirus y Begomovirus, respectivamente. La matriz final incluyó 22 variables, 859 observaciones y 18,898 metadatos. En 100% de muestras analizadas se identificó *Alternaria alternata* y *Bean common mosaic virus* (BCMV) con 99% de homología. *Vaquita Negro*, *Garrapato* y *Canario* fueron estadísticamente los genotipos más susceptibles (37.3 - 58% severidad) a BCMV, mientras *Canario* y *Tipo Flor de Mayo* (41.4 - 42.7%) a *A. alternata* ($p < 0.05$). *Oti* y *Negro Perla* presentaron mayor adaptabilidad climática y tolerancia a ambos patógenos con $IV > 0.7$ e $IDI < 0.43$. Espacialmente, BCMV presentó dispersión aleatoria de focos y efecto de bordo-bloque con contagios continuos de hasta 5.6 metros. *Vaquita Negro* y *Bayo Mecentral* tuvieron dispersión viral uniforme, presuntivamente por alta transmisibilidad viral por semilla. En contraste, con excepción en *Tipo Flor de Mayo* y *Canario*, que exhibieron coalescencia significativa de focos, *A. alternata* tuvo dependencia espacial menor a 8 plantas. El daño por viento y granizo significativamente favoreció la infección de *A. alternata* ($p = 0.05$) sugiriendo su naturaleza oportunista.

Palabras clave: Virus, Hongo, Frijol, Geoestadística, Escalas, Aplicación Android, Severidad

Mesoamérica y Sudamérica, con poblaciones genéticamente diferenciables, pero con un ancestro compartido, son el centro de origen y diversificación del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), con al menos 8000 años de domesticación (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Se estiman aproximadamente 400 especies silvestres de *Phaseolus* spp. con gran variabilidad morfológica y

Mesoamerica and South America, with genetically differentiable populations, but with a shared ancestor, are the center of origin and diversification of the common bean (*Phaseolus vulgaris*), with at least 8000 years of domestication (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Approximately 400 wild species of *Phaseolus* spp. with great morphological and physiological variability are estimated, of which five have been domesticated: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* and *P. polyanthus* (De Ron and Santalla, 2013). Taxonomic and phylogenetic studies estimate 52 species in Mexico, of which 55% are endemic, with Jalisco, Durango and Oaxaca being the regions with the greatest diversity (Delgado and Gama, 2015). In Mexico, the crop has great historical agricultural, sociocultural, economic and nutritional relevance. Its diversity and productive adaptability are evidenced by more than 100 registered varieties (SADER and SNICS, 2022), highlighting *Oti* and black testa materials such as *Negro Perla*, *Negro Jamapa*, and others, for yield, grain quality, or resistance/tolerance to plant pathogens. Worldwide, Mexico is the sixth largest producer (FAOSTAT, 2022), and one of the main per capita consumers with an annual average of 10.4 kg. At the end of 2020, 1 086 733 t were reported, of which, 71% are concentrated in Zacatecas (41%), Sinaloa (13%), Nayarit (9%), Chiapas (6%), and Durango (4%) (SIAP, 2020). This production satisfies 90% of domestic demand, and 10% is imported from the USA, Canada and China.

The prolonged process of domestication and adaptation to diverse environments has detonated parasitic processes of co-evolution between *Phaseolus* spp. and different organisms, highlighting 36 species of phytopathogenic fungi e.g., *Alternaria alternata*, *Pseudocercospora griseola*, and *Colletotrichum lindemuthianum*

fisiológica, de las cuales cinco han sido domesticadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* y *P. polyanthus* (De Ron y Santalla, 2013). Estudios taxonómicos y filogenéticos estiman 52 especies en México, de las cuales 55% son endémicas, siendo Jalisco, Durango y Oaxaca las regiones con mayor diversidad (Delgado y Gama, 2015). En México, el cultivo tiene gran relevancia agrícola, sociocultural, económica y nutricional histórica. Su diversidad y adaptabilidad productiva se evidencia con más de 100 variedades registradas e inscritas (SADER y SNICS, 2022), destacando *Oti* y materiales de testa negra como *Negro Perla*, *Negro Jamapa* y otros, por rendimiento, calidad de grano o resistencia/tolerancia a fitopatógenos. A nivel mundial, México representa el sexto productor (FAOSTAT, 2022), y uno de los principales consumidores *per cápita* con 10.4 kg promedio anual. Al cierre agrícola 2020 se reportaron 1 086 733 t, de las cuales 71% se concentra en Zacatecas (41%), Sinaloa (13%), Nayarit (9%), Chiapas (6%) y Durango (4%) (SIAP, 2020). Esta producción satisface 90% de la demanda nacional y 10% se importa de EUA, Canadá y China.

El prolongado proceso de domesticación y adaptación a diversos ambientes ha detonado procesos coevolutivos parasíticos entre *Phaseolus* spp. y diferentes organismos, destacando 36 especies de hongos fitopatógenos p.e., *Alternaria alternata*, *Pseudocercospora griseola* y *Colletotrichum lindemuthianum* (Berrouet-Vanegas *et al.*, 2014); 26 organismos virales p.e., *Bean common mosaic virus*, *Bean golden yellow mosaic virus* y *Bean common mosaic necrotic virus* (Flores-Estévez *et al.*, 2003); 22 especies de nematodos p.e., *Dolichodoros heterocephalus* y *Aphelenchoides ritzemabosi* (Bird y Warner, 2018); nueve oomycetos p.e., *Phytophthora nicotianae* y *Pythium irregulare* (Watanabe *et al.*, 2007); y seis especies bacterianas (p.e., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Curtobacterium*

(Berrouet-Vanegas *et al.*, 2014); 26 viral organisms, e.g., *Bean common mosaic virus*, *Bean golden yellow mosaic virus*, and *Bean common necrotic mosaic virus* (Flores-Estévez *et al.*, 2003); 22 nematode species, e.g., *Dolichodorus heterocephalus*, and *Aphelenchoides ritzemabosi* (Bird and Warner, 2018); nine oomycetes, e.g., *Phytophthora nicotianae*, and *Pythium irregulare* (Watanabe *et al.*, 2007); and six bacterial species (e.g., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Curvobacterium flaccumfaciens*, and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) (Torres *et al.*, 2009; Gent *et al.*, 2005). Some of these organisms can be endemic, cause syndromes, or occur in mixed infections compromising yield and varietal stability (Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012; Mena and Velázquez, 2010; Estrada-Gómez *et al.*, 2004; Flores-Estévez *et al.*, 2003).

Seed, as the main sowing practice for *P. vulgaris*, represents one of the main risks for the dissemination of Potyvirus, Begomovirus and fungi such as *Alternaria* spp. (Subramanya, 2013). These organisms are widely distributed in Mexico, although with limited epidemiological studies. Systemic viral infections in beans, from infected seed, may cause greater productive detriment and loss of plant vigor due to chronic physiological alterations. Symptomatically, these can be expressed as poor plant development, dwarf, flower, and fruit abortion, and mosaics of yellow to golden tones, chlorosis, epinasty, distortion, and greening of the nervures on leaves (Rojas *et al.*, 2018). In addition, 75% of bean pathogenic viruses are associated with insect vectors (aphids and whiteflies) increasing transmission and dispersal between plants and crop fields (Gilbertson *et al.*, 2015). Among fungal problems, *Alternaria* spp. is not considered of high productive impact on beans despite its endemic status and to cause a typical blight with concentric necrotic spots affecting leaf tissue, pods and seeds

flaccumfaciens y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) (Torres *et al.*, 2009; Gent *et al.*, 2005). Algunos de éstos organismos pueden ser endémicos, presentar síndromes u ocurrir en infecciones mezcladas comprometiendo la producción y estabilidad de variedades (Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012; Mena y Velázquez, 2010; Estrada-Gómez *et al.*, 2004; Flores-Estévez *et al.*, 2003).

La semilla, como principal medio de siembra de *P. vulgaris*, representa uno de los principales riesgos de diseminación de Potyvirus, Begomovirus y hongos como *Alternaria* spp. (Subramanya, 2013). Estos organismos tienen amplia distribución en México, aunque con limitados estudios epidemiológicos. Infecciones virales sistémicas en frijol, a partir de semilla infectada, causan mayor detrimento productivo y pérdida de vigor de planta debido a las alteraciones fisiológicas crónicas, las cuales se expresan sintomatológicamente por disminución en desarrollo vegetativo, enanismo, aborto de flores y frutos, y en hojas con mosaicos de tonalidades amarillas a dorado, clorosis, epinastia, distorsión y enverdecimiento de nervaduras (Rojas *et al.*, 2018). Adicionalmente, 75% de virus fitopatógenos en frijol están asociados a insectos-vectores (áfidos y moscas blancas) en transmisión y dispersión entre plantas y sembradíos del cultivo (Gilbertson *et al.*, 2015). Entre los problemas fungosos, *Alternaria* spp., no es considerado de alto impacto productivo en frijol a pesar de su condición endémica y causar un tizón típico con manchas necróticas concéntricas que afectan tejido foliar, vainas y semillas con defoliación en fases avanzadas (Mena y Velázquez, 2010). La transmisión de *Alternaria* spp. por semilla representa un riesgo fitosanitario adicional que debe investigarse (Prasad y Ahir, 2013; Moraes y Menten, 2006).

En el cultivo de frijol, estratégico en la seguridad alimentaria de México, estudios sistemáticos

with defoliation in advanced stages (Mena and Velázquez, 2010). The transmission of *Alternaria* spp. by seed represents an additional phytosanitary risk that should be investigated (Prasad and Ahir, 2013; Moraes and Menten, 2006).

In the bean crop, strategic in Mexico's food security, systematic and comprehensive studies that articulate health, genetic, and production are limited. This approach would represent a paradigm shift that implies a regional, multidimensional and multi-pest vision to analyze the parasitic and epidemiological processes associated with production risks (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). The objective of this research was to develop etiologically-epidemiological methodologies applicable to breeding programs in bean (*P. vulgaris*) with an integral productive and phytosanitary aim. For this purpose, 12 genotypes of *P. vulgaris*, exposed to natural infections of plant pathogens, were studied in two contrasting phenological events during the spring-summer 2020 season in a region of Mexican central highlands.

MATERIALS AND METHODS

Experimental unit. In May 2020, spring-summer season, a 5 000 m² plot was selected at the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Mexico State. Twelve *Phaseolus vulgaris* genotypes were sown in randomized blocks: *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Tipo Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco*, *Canario*, *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro*, *Negro Perla*, *Vaquita Negro*, *Garrapato*, *OTI*, and *Segregante OTI* (Figure 1A). Each genotype was established in 25 rows 13 m long with 80 cm, and 2 m spacing between furrows and blocks, respectively. A barrier of five maize (*Zea mays*) rows delimited the experimental area. A semi-technological agronomic management

e integrales que articulen sanidad, genotecnia y producción son limitados. Este enfoque representaría un cambio de paradigma que implica una visión regional, multidimensional y multiplaga para analizar procesos parasíticos y epidemiológicos asociados a riesgos productivos (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). El objetivo de esta investigación fue desarrollar metodologías etiológico-epidemiológicas aplicables a estudios de mejoramiento genético del frijol (*P. vulgaris*) con un propósito integral productivo y fitosanitario. Para este fin se estudiaron 12 genotipos de *P. vulgaris*, expuestos a procesos naturales de infección microbiológica, en dos eventos fenológicos contrastantes durante el ciclo primavera-verano 2020 en una región del altiplano mexicano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad experimental. En mayo 2020, ciclo primavera-verano, se seleccionó una parcela de 5 000 m² en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. Se sembraron en bloques aleatorios 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*: *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Tipo Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco*, *Canario*, *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro*, *Negro Perla*, *Vaquita Negro*, *Garrapato*, *OTI* y *Segregante OTI* (Figura 1A). Cada genotipo se estableció en 25 surcos de 13 m de largo con 80 cm y 2 m de separación entre surco y bloques, respectivamente. Una barrera de cinco surcos de maíz (*Zea mays*) delimitó el área experimental. Se aplicó un manejo agronómico semitecnificado con actividades convencionales de fertilización, aporque, control de malezas y riego rodado complementario. En el centroide de la unidad experimental se instaló un sensor climático *HOBO u23 Pro v2* para medición de humedad relativa (HR) y temperatura (°C) a intervalos de 30 min entre

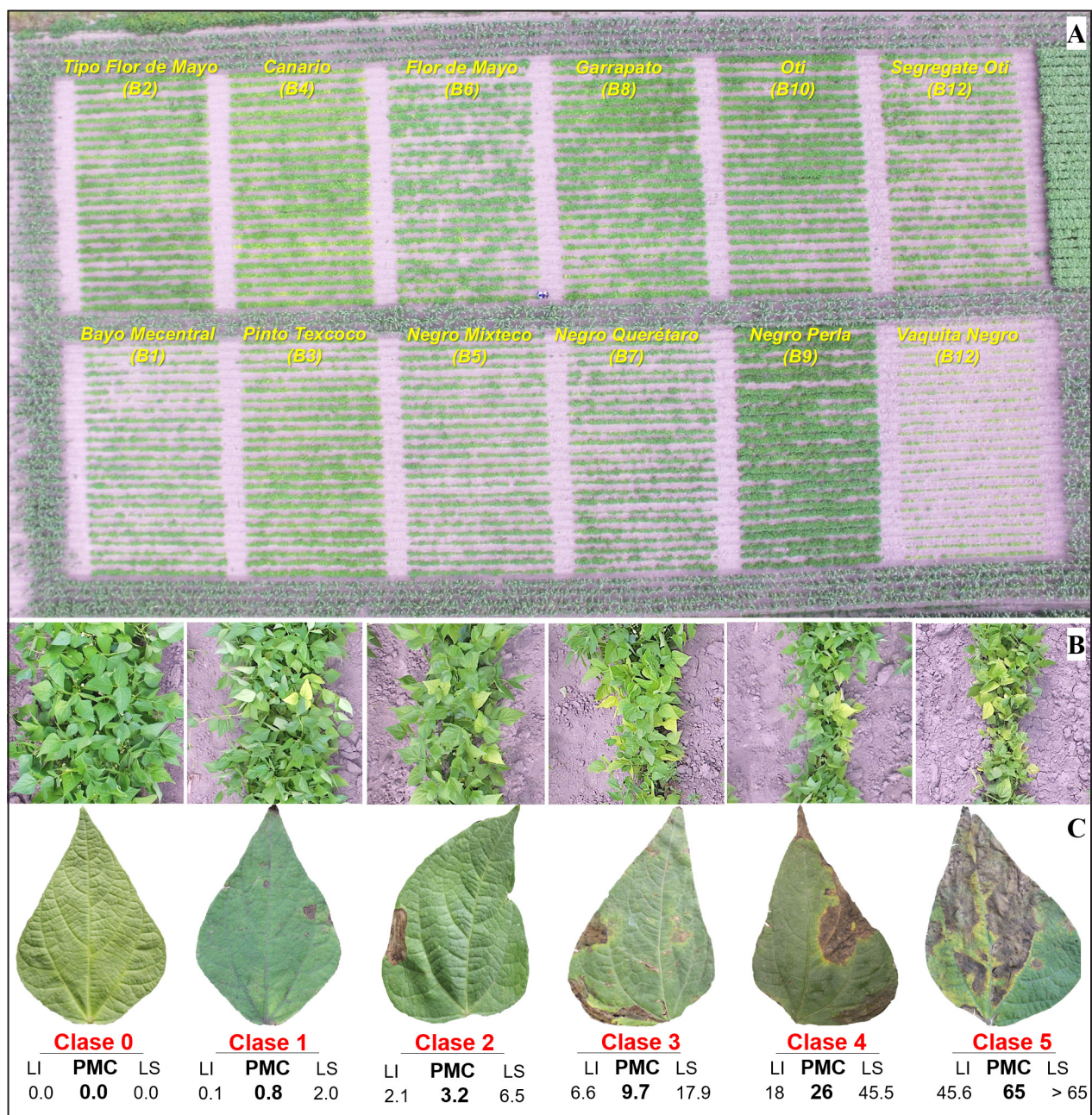


Figure 1. A) Experimental design of 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes randomly distributed under field conditions. Aerial image captured on June 2, 2020, at 50 m from the centroid of the experimental unit using a Phantom 3 DJI® drone. Six-class logarithmic-diagrammatic scale to evaluate virus disease severity, estimated with percentage of mosaic-chlorosis-deformation leaf tissue in a 70 cm row-section (B), and to evaluate blight severity estimated with percentage of necrotic leaf area (C). The scale values apply to both diseases. LI, LS and PMC correspond to the lower, upper and midpoint of class in percentage units, respectively. Spring-Summer 2020 cycle.

Figura 1. A) Diseño experimental de 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris* distribuidos al azar en condiciones de campo. Imagen aérea captada el 2 de junio 2020 a 50 m del centroide del bloque experimental mediante un dron Phantom 3 DJI®. Escala logarítmica-diagramática de seis clases para evaluar severidad viral, estimado con porcentaje de tejido foliar clorótico en una sección de 70 cm de surco (B), y para evaluar severidad de tizón estimado con porcentaje de área foliar necrótico (C). Los valores de la escala aplican para ambas enfermedades. LI, LS y PMC corresponden a los límites inferior, superior y punto medio de clase en unidades porcentuales, respectivamente. Ciclo Primavera-Verano 2020.

was implemented with conventional fertilization, hilling, weed control, and complementary irrigation. A *HOBO u23 Pro v2* climate sensor was installed at the centroid of the experimental unit to measure relative humidity (RH) and temperature (°C), at 30 min intervals, between 1-June and 15-August 2020. Complementarily climatic data were obtained from the meteorological station of the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

Experimental variables and severity. Using App-Monitor® v1.1 Android®, available at PlayStore® (CP-LANREF, 2021), the coordinates, spatial location (state, municipality, and locality), crop name, plot extension, crop phenology, technification, irrigation, plantation density, and owner's name were recorded in the *characterization digital module*. Epidemiological variables were evaluated in 13 plants/row in 5-6 rows/genotype by means of a 1 x 2 discontinuous systematic sampling. Two evaluations were made, one on flowering (6-June), and other on the fruit setting stage (10-August). Per plant, the virus symptoms severity, and leaf blight, the two infectious problems with the highest occurrence among genotypes, were evaluated. In addition, the presence or absence of *Bemisia* sp. and *Aphis* spp., as potential virus vectors, was reported. Percentage of severity was evaluated using a 6-class logarithmic-diagramatic scale (González-Cruces *et al.*, 2020). Class midpoint (CMP), lower limit (LL) and upper limit (UL) were calculated in 2-Log v2.0 employing the parameters of *Number of classes* = 6 and $Y_{max} = 65\%$ (CP-LANREF, 2018. Unpublished). With virus symptoms, severity represented the percentage of mosaic-chlorosis-deformation tissue in a 70 cm row-section (Figure 1B); in blight, severity indicated the necrotic percentage of leaf area of the most infected leaflet/plant (Figure 1C). The severity scales were configured in App-Monitor®. A total of 12 assessors performed the

1-junio y 15-agosto 2020. Complementariamente se obtuvieron datos climáticos de la estación meteorológica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

Variables experimentales y severidad. Mediante App-Monitor® v1.1 Android®, disponible en PlayStore® (CP-LANREF, 2021), se registró en el *módulo digital de caracterización* las coordenadas, ubicación espacial (estado, municipio y localidad), nombre del cultivo, superficie, fenología, tecnificación, riego, densidad de plantación y nombre de propietario. Las variables epidemiológicas se evaluaron en 13 plantas/surco en 5-6 surcos/genotipo mediante un muestreo sistemático discontinuo 1 x 2. Se realizó una evaluación en el evento fenológico de floración (6-junio) y otra en fructificación (10-agosto). Por planta, se evaluó la severidad de síntomas virales y de un tizón foliar, los dos problemas infecciosos con mayor ocurrencia entre genotipos. Adicionalmente, se reportó presencia o ausencia de *Bemisia* sp. y *Aphis* spp., como potenciales vectores de virus.

El porcentaje de severidad se evaluó mediante una escala logarítmica-diagramática de 6-clases (González-Cruces *et al.*, 2020). El punto medio de clase (PMC), límite inferior (LI) y superior (LS) se calcularon en 2-Log v2.0 empleando los parámetros de *Número de clases* = 6 y $Y_{max} = 65\%$ (CP-LANREF, 2018. No publicado). En virosis, la severidad representó el porcentaje de tejido con mosaico-clorosis-deformación en una sección de 70 cm de surco (Figura 1B); en tizón, la severidad indicó el porcentaje necrótico de área foliar del foliolo más infectado/planta (Figura 1C). Las escalas de severidad se configuraron en App-Monitor®. Un total de 12 evaluadores realizaron las mediciones en cada fecha. Los datos se almacenaron en la App y posteriormente se exportaron en MS Excel para integración de la matriz epidemiológica y análisis

measurements on each date. Data were stored in the App and subsequently exported in MS Excel for integration of the epidemiological data matrix and further system approach analysis (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

Vigor Index. A coverage-plant vigor analysis was carried out during the flowering stage, assisted by 14 mpx RGB digital aerial images captured by a DJI® Phantom 3 drone between 15:00 and 17:00 h. The flights were performed in vertical trajectory from the centroid of the experimental unit (50 m height) and of each plot per genotype (3 and 5 m). The images were processed with Gimp® v2.10.20. By genotype, a *Coverage Vigor Index (IV)* = $[(CF_{Gi})/(AT_{Gi})]*100$ was obtained, where *Gi* is genotype-*i*, *CF* is coverage-plant area, and *AT* is total area (soil + coverage-plant).

Integrated Damage Index. In order to evaluate integrated health, with virus and blight severity data, and the *Vigor Index* as a correction factor, an *Integrated Damage Index* was calculated by genotype: $(IDI) = [(3(\bar{x}CV_{Gi}) + 1 (\bar{x}AL_{Gi}))/260] + (1-IV_{Gi})$, where *Gi* is genotype-*i*, *CV* percentage of virus disease severity, *AL* percentage of blight severity, and *IV* *Coverage Vigor Index*.

Sampling of plant material. In order to identify the agent(s) associated with blight, five samples were collected from the three genotypes with the highest incidence: *Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco*, and *Canario*. Samples were collected targeting leaflets with concentric necrotic spots and leaf with 1 - 3 severity classes (0.01 - 20%) of the severity scale (Figure 1C). For virus symptoms, 20 and 18 trifoliolate samples were collected with mosaic-epinasty and severe chlorosis-wrinkling symptoms, putatively associated with Potyvirus and Begomovirus, respectively. Sampling was representatively performed on the 12 genotypes.

bajo un enfoque de sistemas (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

Índice de Vigor. Se realizó un análisis de cobertura foliar en fase de floración, asistido por imágenes aéreas digitales RGB de 14 mpx capturadas mediante dron Phantom 3 DJI® entre las 15:00 y 17:00 h. Los vuelos se realizaron en trayectoria vertical desde el centroide de la unidad experimental (50 m de altura) y de cada parcela por genotipo (3 y 5 m). Las imágenes se procesaron con Gimp® v2.10.20. Por genotipo, se obtuvo un *Índice de Vigor de Cobertura (IV)* = $[(CF_{Gi})/(AT_{Gi})]*100$, donde *Gi* es el genotipo-*i*, *CF* área de cobertura foliar y *AT* es área de cobertura total (suelo + cobertura foliar).

Índice de Daño Integrado. Con el objetivo de evaluar la sanidad integral, con datos de severidad de virus y tizón, y el *Índice de Vigor* como factor de corrección, se calculó un *Índice de Daño Integrado* por genotipo $(IDI) = [(3(\bar{x}CV_{Gi}) + 1 (\bar{x}AL_{Gi}))/260] + (1-IV_{Gi})$, donde *Gi* es el genotipo-*i*, *CV* porcentaje de severidad viral, *AL* porcentaje de severidad de tizón e *IV* *Índice de Vigor de Cobertura*.

Colecta de material vegetal. Con el fin de identificar el agente(s) asociado al tizón se colectaron cinco muestras en los tres genotipos con mayor incidencia: *Tipo Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco* y *Canario*. Las muestras se colectaron de forma dirigida a foliolos con manchas necróticas concéntricas y severidad de hoja con clases 1 - 3 (0.01 - 20%) de la escala de severidad (Figura 1C). Para síntomas virales, se colectaron 20 y 18 muestras trifoliadas con síntomas de mosaico-epinastia y clorosis-arrugamiento severo, putativamente asociados a Potyvirus y Begomovirus, respectivamente. El muestreo se realizó representativamente en los 12 genotipos.

Aislamiento y caracterización del organismo asociado al tizón. Un total de cinco hojas sintomáticas del genotipo *Tipo Flor de Mayo* se cortaron

Isolation and characterization of the blight-associated organism. A total of five symptomatic leaves of the genotype *Flor de Mayo* were cut into 10 5-mm squares from the marginal lesion zone and disinfested for 2 min with 1% sodium hypochlorite (NaClO), followed by three washes with sterile distilled water. Five mycelial growths were re-isolated and incubated in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium (Difco®). After seven days, the sporulation pattern, conidiophores and conidia were reviewed using a stereo microscope (IROSCOPE YZ-6). With the hyphal tip technique, the isolates were purified on PDA and a mycelial growth characterization was performed. Mycelial color, morphology, and conidial morphometry were determined on 64 conidia/isolate. Fixed slides were made for compound microscopy (Velab VE-B2 of 10x and 40x) integrated to the Motic Images Plus v2.0 program. Identification was performed with taxonomic keys (Simmons, 2007; Barnet and Hunter, 1998). The characterization of isolates was documented photographically using a Canon EOS REBEL T6, 24.1 MP®.

Koch's postulates. Twelve apparently healthy *Flor de Mayo* leaflets (4-5 cm wide and 5-6 cm long) were selected. They were disinfested with the previously described technique and dried in a laminar flow hood for 30 min. The 12 leaflets were placed individually in the center of Petri dishes, used as humid chambers, with an upper mesh and sterile absorbent paper below. Three treatments were carried out with three replicates and an absolute control. The treatments were inoculum of pure FPTA2h, FPTA3h, and FPTA4h isolates obtained from leaf blight and selected at random. Four discs with full mycelial growth (0.5 cm diameter)/isolate were distributed on the upper leaf blade. The absolute control consisted of leaflets without inoculation. The Petri dishes

en 10 cuadros de 5 mm a partir de la zona marginal de lesión y desinfectaron por 2 min con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Se reaisló e incubó en cajas Petri con medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Difco®) five crecimientos miceliales. Después de siete días se revisó el patrón de esporulación, conidióforos y conidias mediante un microscopio estereoscópico (IROSCOPE YZ-6). Con la técnica de punta de hifa se purificaron los aislados en PDA y se realizó la caracterización del crecimiento micelial. Se determinó coloración micelial, morfología y morfometría conidial en 64 conidios/cepa. Se realizaron preparaciones fijas para microscopio compuesto (Velab VE-B2 de 10x y 40x) integrado al Programa Motic Images Plus v2.0. La identificación se efectuó con claves taxonómicas (Simmons, 2007; Barnet y Hunter, 1998). La caracterización de aislados se documentó fotográficamente mediante una cámara Canon EOS REBEL T6, 24.1 MP®.

Postulados de Koch. Se seleccionaron 12 folíolos de *Flor de Mayo* (de 4-5 cm de ancho y 5-6 cm de largo) aparentemente sanos. Se desinfectaron con la técnica previamente descrita y se secaron en campana de flujo laminar durante 30 min. Los 12 folíolos se colocaron individualmente al centro de cajas de Petri, acondicionadas como cámaras húmedas, con una malla superior y papel absorbente estéril al fondo. Se realizaron tres tratamientos con tres repeticiones y un testigo absoluto. Los tratamientos fueron inóculo de las cepas puras FPTA2h, FPTA3h y FPTA4h aisladas del tizón foliar y seleccionadas al azar. En el haz de cada folíolo se distribuyeron cuatro discos con crecimiento micelial (0.5 cm diámetro) / cepa. El testigo absoluto consistió en folíolos sin inoculación. Las cajas Petri se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 °C y 90% de humedad relativa (HR) con fotoperiodo 12:12 h durante 7 d.

were incubated in a growth chamber at 25 °C and 90% relative humidity (RH) with a 12:12 h photoperiod for 7 d. Seven days after inoculation, the pathogenicity of each strain was evaluated by recording the presence or absence of typical blight symptoms. Six symptomatic leaves were selected, and the infective organism was re-isolated in Petri dishes with PDA. One colony per leaf was taken at random for morphological characterization.

Extraction of total nucleic acids. Extraction of total DNA from five, and total DNA and RNA from 5 and 37 samples was performed by the modified AP (SDS1%) method (Green and Sambrook, 2012). A total of 0.1 g of pure culture mycelium and leaf tissue was used for identification by partial genomic sequence of the fungus and putative viral agent(s), respectively. Optimal thresholds of nucleic acid concentration and purity were quantified with a NanoDrop spectrophotometer 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, USA).

Selection and in silico primers validation for genomic identification. Based on viral-like symptomatology in the field, infection of a member(s) of Potyvirus and/or Begomovirus genus was assumed. For genomic identification, three universal primer pairs were selected based on amplification on: **1)** the nuclear inclusion coding region of protein B (NIb) in Potyvirus genomes; **2)** the ORF BL1 of DNA-B in Begomovirus; and **3)** the ITS region of the rDNA for eukaryotes (Table 1). The primers specificity associated with criteria 1 and 2 was assessed by local alignment using Blast[®] with genomic sequences registered at the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). For pathogens putatively associated with viral symptoms, a set of 22 nucleotide sequences specific for *Bean golden yellow mosaic virus* and *Bean dwarf mosaic virus* (Begomovirus), and

Siete días después de la inoculación se evaluó la patogenicidad de cada cepa registrando presencia o ausencia de síntomas típicos de tizón. Se seleccionaron seis hojas sintomáticas y se reisoló al organismo infectivo en cajas Petri con PDA. Se tomó al azar una colonia por hoja para la caracterización morfológica.

Extracción de ácidos nucleicos totales. La extracción de ADN de cinco, y ADN y ARN total de un total de 37 muestras se realizó por el método AP (SDS1%) modificado (Green y Sambrook, 2012) a partir de 0.1 g de micelio de cultivo puro y tejido foliar para identificación por secuencia genómica parcial del hongo y del putativo agente(s) viral, respectivamente. Umbrales óptimos de concentración y pureza de ácidos nucleicos se cuantificaron en espectrofotometría con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA).

Selección y validación in silico de iniciadores para identificación genómica. Con base en la sintomatología de tipo viral en campo se asumió la infección de un miembro(s) del género Potyvirus y/o Begomovirus. Para la identificación genómica, se seleccionaron tres pares de iniciadores universales con base en criterios de amplificación sobre: **1)** La región codificadora de la inclusión nuclear en la proteína B (NIb) en genomas de Potyvirus; **2)** el ORF BL1 del ADN-B en Begomovirus; y **3)** la región ITS del rADN para eucariontes (Cuadro 1). La especificidad de iniciadores asociados a los criterios 1 y 2 se evaluó mediante alineamiento local empleando Blast[®] con secuencias genómicas registradas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para patógenos putativamente asociados a los síntomas virales, se generó un grupo de 22 secuencias de nucleótidos específicas para *Bean golden yellow mosaic virus* y *Bean dwarf mosaic* (Begomovirus), y *Bean common mosaic virus*

Table 1. Name of the selected universal primer, sequence, and amplicon size for genomic identification of Potyvirus and Begomovirus species, and for eukaryotic microorganisms.
Cuadro 1. Nombre del iniciador universal seleccionado, secuencia, y tamaño del amplicon para identificación genómica de especies pertenecientes a Potyvirus y Begomovirus, y para microorganismos eucariotes.

| Organismo | Iniciador | Secuencia | Tamaño de Amplicon (pb) | Cita |
|-------------|--------------------|---|-------------------------|----------------------------|
| Potyvirus | NIb2F
NIb3R | 5' GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA
3' TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC | 350 | Zheng <i>et al.</i> , 2008 |
| Begomovirus | PBL1v2040
PCR1c | 5' CARTGRTCKATCTTCATACA
3' CATATTTACRARWATGCCA | 500~650 | Rojas <i>et al.</i> , 1993 |
| Hongo | ITS1
ITS4 | 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG
3' TCCTCCGCTTATTGATATGC | ~500 | White <i>et al.</i> , 1990 |

Bean common mosaic virus (Potyvirus) reported in America for *P. vulgaris* were selected. The sequences were aligned with the respective primers using the Clustal W algorithm in MEGA 7.0.26 software.

Fungus molecular identification. Genomic identification of five fungal isolates was performed by amplifying the ITS region of the ribosomal DNA in a 25 µL final sample composed of: 1X PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs mix, 400 nM of primers ITS1 and ITS4 (Table 1), 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 40 ng of total DNA and nuclease-free water. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed on the T-100 thermal cycler (BioRad). A processing program was run consisting of initial denaturation at 95 °C for 5 min and 31 cycles with denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 55 °C for 1 min, extension at 72 °C for 90 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplified fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide and visualized with UV light in an imaging system (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).

(Potyvirus) reportados en América para *P. vulgaris*. Las secuencias se alinearon con los iniciadores respectivos empleando el algoritmo Clustal W en el software MEGA 7.0.26.

Identificación molecular del hongo. La identificación genómica de cinco cepas fungosas se realizó amplificando la región ITS del ADN ribosomal en una muestra final de 25 µL integrada por: 1X de Buffer PCR, 1 mM de MgCl₂, 0.2 mM del mix dNTPs, 400 nM de los iniciadores ITS1 e ITS4 (Cuadro 1), 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 40 ng de ADN total y agua libre de nucleasas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en el termociclador T-100 (BioRad). Se ejecutó un programa de procesamiento que consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min y 31 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 90 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV en fotodocumentador (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).

Virus complex molecular identification. In 20 samples presumptively associated with Potyvirus symptoms, the synthesis of complementary DNA (cDNA) from total RNA was performed in two steps. In the first step, the reaction mixture with: 9.75 μ L nuclease-free water, 500 nM per primer (N1b2F - N1b3R) and 2.5 μ L total RNA, incubated at 85 °C for 3 min in a T100 thermocycler (Bio-Rad). In the second step, a mixture with: 2 mM mix dNTP's, 1X buffer-RT, 100 U of reverse transcriptase enzyme (M-MLV-RT) and 10 U of ribonuclease inhibitor (RNAsin), all from Promega Corp. USA. The total reaction volume was 20 μ L incubated at 44 °C for 60 min, followed by inactivation of the enzyme at 92 °C for 10 min. RT-PCR was performed in a final volume of 25 μ L consisting of: 12.5 μ L of Gotaq® G2 Hot star mix, 500 nM of N1b2F - N1b3R primers (Table 1) and 2.5 μ L of cDNA. The final volume was completed with nuclease-free water. Using the T-100 thermal cycler (BioRad), a program was run consisting of: initial denaturation at 95 °C for 2 min, 35 cycles with denaturation at 95 °C for 45 s, alignment at 45 °C for 45 s, extension at 72 °C for 45 s and a final extension at 72 °C for 5 min.

For 18 putative Begomovirus samples, the PCR reaction mixture had a final volume of 25 μ L containing: 1X GoTaq® buffer, 0.2 mM dNTP's mix, 300 nM of the primers PBL1v2040 - PCR1c (Table 1), 0.5 U of GoTaq® G2 and 2 μ L of DNA. The final volume was volumetrically gauged with nuclease-free water. The thermocycling program executed was initial denaturation at 95 °C for 3 min, 30 cycles with denaturation at 94 °C for 30 s, alignment at 50 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplified fragments of samples presumptive to Potyvirus and Begomovirus were analyzed by electrophoresis with the methodology analogous to the identification of the fungus.

Identificación molecular del complejo viral. En 20 muestras presuntamente asociadas a síntomas de Potyvirus, se realizó en dos pasos la síntesis de ADN complementario (cADN) a partir del ARN total. En el primer paso, la mezcla de reacción con: 9.75 μ L de agua libre de nucleasas, 500 nM por primer (N1b2F - N1b3R) y 2.5 μ L de ARN total, incubado a 85 °C durante 3 min en un termociclador T100 (Bio-Rad). En el segundo paso, se añadió a la reacción una mezcla con: 2 mM de mix dNTP's, 1X buffer-RT, 100 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV-RT) y 10 U del inhibidor de la ribonucleasa (RNAsin), todos de Promega Corp. EUA. El volumen total de reacción fue de 20 μ L incubada a 44 °C durante 60 min, seguido de inactivación de la enzima a 92 °C durante 10 min. La PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L integrado por: 12.5 μ L de mix Gotaq® G2 Hot star, 500 nM de los iniciadores N1b2F - N1b3R (Cuadro 1) y 2.5 μ L de cADN. El volumen final se completó con agua libre de nucleasas. Con el termociclador T-100 (BioRad) se ejecutó un programa que consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 45 s, alineamiento a 45 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 45 s y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Para 18 muestras putativas a Begomovirus, la mezcla de la reacción de PCR tuvo un volumen final de 25 μ L que contenía: 1X de buffer GoTaq®, 0.2 mM de mix dNTP's, 300 nM de los iniciadores PBL1v2040 - PCR1c (Cuadro 1), 0.5 U de GoTaq® G2 y 2 μ L de ADN. El volumen final se aforó con agua libre de nucleasas. El programa de termociclaje ejecutado fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 50 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 45 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados de muestras presuntivas a Potyvirus y Begomovirus se analizaron por

Sequencing and bioinformatics analysis. A total of 23 samples that amplified by PCR were sent for nucleotide sequencing (Macrogen® Seoul, Korea). With the sequences and reference sequences for each organism group, bioinformatic analyses were performed including: **1)** Generation of the consensus sequence with the SeqAssem v07 program; **2)** Local alignment with Blast-n® at NCBI; **3)** Evaluation of the percentage of homology and coverage with the amplified genomic region; and **4)** Phylogenetic reconstruction in MEGA v7.0.26 using maximum likelihood and/or maximum parsimony as clustering methods.

Spatial analysis. The *intra-* and *inter-*plot geospatial analysis was performed with Golden Surfer® v10. The data matrix by phenological event and genotype was structured with x = row, y = plant spacing (fungus) or 70 cm row-section (virus), and z = percentage of severity of virus symptoms or blight. Geostatistical analysis was performed with the kriging method represented in two-dimensional maps and contours. Spatial dependence and autocorrelation were calculated with omnidirectional variograms fitted to a spherical model. By genotype, the graphic indicators *nugget* (n), σ^2 -*partial* (σ^2 - p), and sill of σ^2 (σ^2 - s) were obtained to determine the level of continuous spatial dependence.

Abiotic damage associated with fungal infection. Due to the distribution of blight in the field, predominantly basal on the plant, and record of a hail event at the early crop stage, a simulated hail (G), wind (V) and soil friction (S) damage trial was conducted on leaf tissue of *P. vulgaris* to evaluate its implication in the infection process and blight development under greenhouse conditions. The trial was established with a total of nine asymptomatic *Flor de Mayo* leaflets, distributed

electroforesis con metodología análoga a la identificación del hongo.

Secuenciación y análisis bioinformáticos. Un total de 23 muestras que amplificaron por PCR fueron enviadas a secuenciación de nucleótidos (Macrogen® Seúl, Corea). Con las secuencias obtenidas y secuencias de referencia para cada grupo de organismo, se realizaron análisis bioinformáticos que incluyeron: **1)** Generación de la secuencia consenso con el programa SeqAssem v07; **2)** Alineamiento local con Blast-n® en el NCBI; **3)** Evaluación del porcentaje de homología y cobertura con la región genómica amplificada; y **4)** Reconstrucción filogenética en MEGA v7.0.26 usando máxima probabilidad y/o máxima parsimonia como métodos de agrupamiento.

Análisis espacial. El análisis geoespacial *intra-* e *inter-*parcelario se realizó con Golden Surfer® v10. La matriz por evento fenológico y genotipo se estructuró con x = surco, y = distanciamiento de planta (hongo) o sección de 70 cm de surco (virus), y z = porcentaje de severidad de síntomas virales o de tizón. El análisis geoestadístico se realizó con el método kriging representado en mapas bidimensionales y contornos. La dependencia y autocorrelación espacial se calculó con variogramas omnidireccionales ajustados a un modelo esférico. Por genotipo, se obtuvieron los indicadores variográficos *nugget* (n), σ^2 -*parcial* (σ^2 - p), y *sill* o meseta de σ^2 (σ^2 - s) para determinar el nivel de dependencia espacial continua.

Daño abiótico asociados a la infección del hongo. Debido a la distribución del tizón en campo, predominantemente basal en planta y registro de un evento de granizo en fases tempranas del cultivo, se realizó un ensayo de daños simulados por Granizo (G), Viento (V) y fricción por Suelo (S) en tejido

in three replicates per treatment. The hail effect was simulated by impacting five frozen hydrogel spheres of 0.5 cm diameter at 10 cm from each leaflet. Wind simulation was performed by friction between leaflets by means of air generated with a fan (Taurus rush® 20 inches) at 1300 rpm, during 5 min. For the Soil effect, a total of 2 kg of soil was gradually dispersed over the leaf tissue. Absolute controls were asymptomatic leaflets, without exposure to damage and sprayed with sterile distilled water.

Immediately after the simulation, the upper blade of each leaflet was inoculated by spraying 20000 (C1), 39000 (C2) and 49000 (C3) conidia per mL⁻¹ of the FPTA2h isolate. Each leaflet was placed in 2 mL tubes immersing the peduncle in sterile distilled water to maintain turgor during the experiment. This material was placed inside polypropylene bags to avoid contamination. From symptomatic leaves, the organism was re-isolated in Petri dishes with PDA eight days after inoculation. Six preparations of direct lesion structures were made for identification under compound microscopy (10x and 40x Velab VE-B2) using the previously cited taxonomic keys. Additionally, a digital collection of 12 images of damaged leaf tissue was generated to quantify the percentage of severity by processing with GIMP 2.10®. The results were analyzed in SAS v9.4 software using ANOVA in a BCA design and the PROC GLM procedure with the combination of simulated damage type (*G*, *V*, *S*, *T*) and concentration (*C_i*) as treatments.

Statistical analysis. An epidemiological matrix with 859 observations, 22 variables, and 18898 total metadata was integrated with MS Excel for statistical analysis in *Statistical Analysis Software* (SAS®) v9.4. Viral symptom severity, blight, *Integrated Damage Index*, and *Vigor Index* were used as response variables, whereas genotype and phenological event were experimental factors.

foliar de *P. vulgaris* para evaluar su implicación en el proceso de infección y desarrollo del tizón en condiciones de invernadero. Se utilizó un total de nueve folíolos asintomáticos del genotipo *Flor de Mayo* distribuidos en tres repeticiones por tratamiento. El efecto Granizo se simuló impactando a 10 cm de cada folíolo cinco esferas de hidrogel congelado de 0.5 cm de diámetro. La simulación de Viento se realizó mediante fricción entre folíolos por medio del aire generado con un ventilador (Taurus rush® 20 pulgadas) a 1300 rpm, durante 5 min. Para el efecto Suelo se utilizó un total de 2 kg de suelo gradualmente dispersado sobre el tejido foliar. Los Testigos absolutos fueron folíolos asintomáticos, sin exposición a daños y asperjado con agua destilada estéril.

Inmediatamente después de la simulación, el haz de cada folíolo se inoculó por aspersión las concentraciones 20000 (C1), 39000 (C2) y 49000 (C3) conidios por mL⁻¹ cepa FPTA2h. Cada folíolo se colocó en tubos de 2 mL sumergiendo el pedúnculo en agua destilada estéril para mantener la turgencia durante el desarrollo del experimento. Este material se colocó dentro de bolsas de polipapel para evitar contaminación. A partir de hojas sintomáticas se reaisló el organismo en cajas Petri con PDA ocho días después de la inoculación. Se realizaron seis preparaciones de estructuras directas de la lesión para identificación en microscopio compuesto (Velab VE-B2 de 10x y 40x) mediante las claves taxonómicas referidas. Adicionalmente, se generó un acervo digital con 12 imágenes de tejido foliar dañado para cuantificar el porcentaje de severidad mediante procesamiento con GIMP 2.10®. Los resultados se analizaron en software SAS v9.4 mediante ANOVA en un diseño BCA y el procedimiento PROC GLM con la combinación tipo de daño simulado (*G*, *V*, *S*, *T*) y concentración (*C_i*) como tratamientos.

Análisis estadístico. Una matriz epidemiológica con 859 observaciones, 22 variables y 18898

Descriptive analyses were performed by variable and phenological events with PROC UNIVARIATE for normality tests through Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). Analysis of variance (ANOVA) for a completely randomized design (CRD) with nested replications was performed with PROC GLM and Tukey mean comparison ($\alpha = 0.05$). Comparison between phenological events was performed with t -Student ($\alpha = 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological and molecular fungus identification. The FTFMA1h, FPTA2h, FPTA3h, FPTA4h, and FPTA5h fungus isolates were characterized by black mycelial growth with 5 to 8 conidia-chain per conidiophore (Figure 2A). A total of 64 mature conidia of FPTA2h isolate were morphometrically measured, showing an average length and width of 7.53 μm (range 3.8 - 12.3 μm) and 3.23 μm (range 2 - 4.6 μm), respectively. Conidium had 3 - 5 transversal, and 1-2 longitudinal septa (Figure 2A). Based on these characteristics, the fungus was identified as *Alternaria alternata* (Berrouet *et al.*, 2014; Simmons, 2007; Barnet and Hunter, 1998).

A. alternata was confirmed by molecular amplification of optimal fragments 500-600 bp ITS region. Threshold concentrations of 127.7 - 482.3 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ and purity 1.88 - 2.18 nm were obtained. Five sequences were aligned at NCBI and confirmed the taxonomic identification of *A. alternata* with 99 - 100% homology regarding the *A. alternata* accession AF347031.1. The sequences were registered in GenBank with accession numbers OL229866, OL229867, OL229868, OL229869, and OL229870. The phylogenetic analysis, using the maximum likelihood method ($i=1000$) for ITS region and 100% node support, clustered all five

metadatos totales se integró en MS Excel para análisis estadístico en *Statistical Analysis Software* (SAS®) v9.4. La severidad de síntomas virales, tizón, *Índice de Daño Integrado* e *Índice de Vigor* se emplearon como variables respuesta, mientras que genotipo y evento fenológico fueron factores experimentales. Se realizaron análisis descriptivos por variable y evento fenológico mediante PROC UNIVARIATE para pruebas de normalidad mediante Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). El análisis de varianza (ANOVA) para un diseño completamente al azar (DCA) con repeticiones anidadas se realizó con PROC GLM y comparación de medias con Tukey ($\alpha = 0.05$). La comparación entre eventos fenológicos se realizó con t -Student ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica y molecular del hongo. Las cepas fungosas FTFMA1h, FPTA2h, FPTA3h, FPTA4h y FPTA5h se caracterizaron por exhibir crecimiento micelial negro con presencia de 5 a 8 conidios en cadena (Figura 2A). La determinación morfométrica de 64 conidios maduros de la cepa FPTA2h mostró longitud y ancho promedio de 7.53 μm (rango 3.8 - 12.3 μm) y 3.23 μm (rango 2 - 4.6 μm), respectivamente. Se identificaron conidios con 3-5 septos y 1-2 longiseptos (Figura 2A). Con base en estas características se identificó al hongo como *Alternaria alternata* (Berrouet *et al.*, 2014; Simmons, 2007; Barnet y Hunter, 1998). La confirmación molecular de *A. alternata* se realizó mediante amplificación de fragmentos óptimos de 500-600 pb ITS. Se obtuvieron umbrales concentración de 127.7 - 482.3 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ y pureza 1.88 - 2.18 nm. El alineamiento de las cinco secuencias en NCBI confirmó la identificación taxonómica de *Alternaria alternata* con rango 99 - 100% homología con la accesión AF347031.1

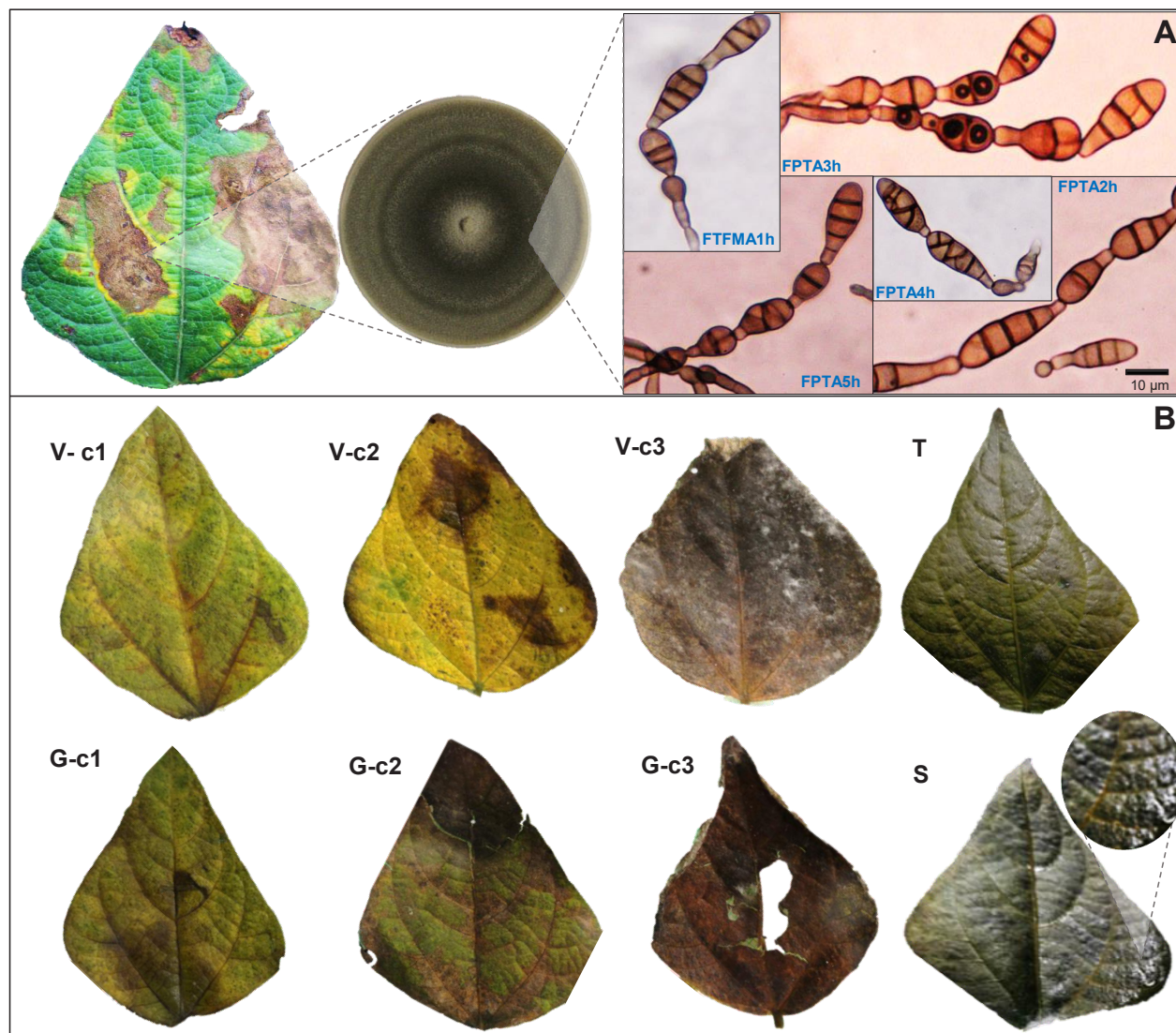


Figure 2. A. *Alternaria alternata* identification by symptom Association - Culturing - Identification based on morphometry of dyciospores in chain, short pedicels, conidiophores (see description in text). B. Simulation of wind (V), hail (G), and soil friction (S) effect damage on *Alternaria alternata* infection under controlled conditions. c1 = 20000, c2 = 39000, c3 = 49000 conidia mL⁻¹ FPTA2h isolate; T = Control. Except for S, which exhibited a bacterial-type biofilm, mechanical damage was favorable for fungus infection.

Figura 2. A. Identificación de *Alternaria alternata* por Asociación del síntoma – Aislamiento – Identificación por morfometría de dyciosporas en cadena, pedicelos cortos, conidióforos (ver descripción en texto). B. Simulación del efecto de daños por viento (V), granizo (G) y fricción de suelo (S) en la infección de *Alternaria alternata* en condiciones controladas. c1 = 20000, c2 = 39000, c3 = 49000 conidios mL⁻¹ cepa FPTA2h; T = Testigo. Con excepción de S, el cual exhibió un biofilm de tipo bacteriano, el daño mecánico favoreció la infección del hongo.

sequences with the accession AF347031.1. The reference sequences of *Alternaria alternantherae* (KC584179.1) and *Stemphylium amaranthi* (KU850503.1) were clearly separated from the *A. alternata* node (Figure 3A). However, since *A. alternata* (*Alternaria* sect. *alternaria*) is an evolutionary diverse group, with morphological and molecular ITS attributes potentially overlapping

de *A. alternata*. Las secuencias se registraron en GenBank con los números de accesión OL229866, OL229867, OL229868, OL229869 y OL229870. El análisis filogenético con el método de máxima verosimilitud ($i=1000$) para la región ITS y 100% de soporte de nodo, confirmó la agrupación de las cinco secuencias con la accesión AF347031.1. Las secuencias de referencia para *Alternaria alternan-*

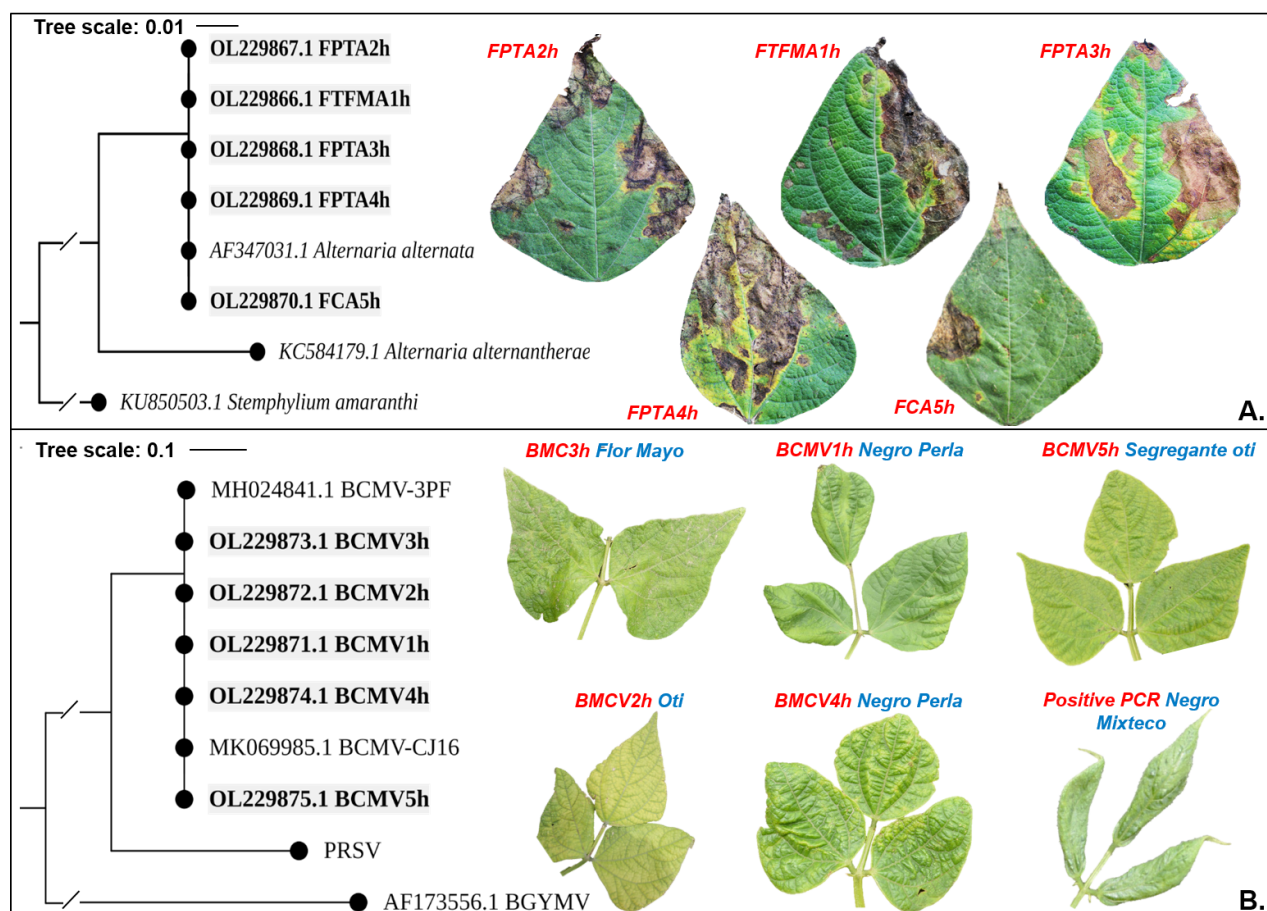


Figure 3. Bioinformatic analysis through amplified sequences of universal genomic regions and maximum likelihood with 1000 Bootstrap repeats. A) *A. alternata* identification through ITS1 and ITS4, HKY+G model with 99% homology with respect to GenBank isolate AF347031.1. B) *Bean common mosaic virus* identification through Nib2F and Nib3R, Tamura-Nei model with 99% homology with two accessions of this virus from GenBank. Bold sequences correspond to samples obtained in this work.

Figura 3. Análisis bioinformático mediante secuencias amplificadas de regiones genómicas universales, máxima verosimilitud y 1000 repeticiones Bootstrap. A) Identificación de *A. alternata* mediante ITS1 y ITS4, modelo HKY+G con 99% de homología respecto del aislado AF347031.1 del GenBank. B) Identificación de *Bean common mosaic virus* con Nib2F y Nib3R, modelo Tamura-Nei con 99% de homología a dos accesiones de este virus del GenBank. Secuencias en negritas corresponden a muestras obtenidas en este trabajo.

among species, complementary studies may be necessary (Armitage *et al.*, 2020).

***Alternaria alternata* pathogenicity tests.**

Pathogenicity of FPTA2h, FPTA3h, and FPTA4h *A. alternata* isolates was confirmed on leaf tissue of *P. vulgaris* genotype *Tipo Flor de Mayo*. The control leaflets did not reproduced symptoms. On average, seven days after inoculation, 100% of leaflets showed symptoms as dark-brown or black necrotic lesions accompanied by chlorotic extending halos. Colonial and conidial morphometry adheres to the taxonomic characteristics of *Alternaria alternata* in all leaflets infected (Simmons, 2007; Barnet and Hunter, 1998), confirming Koch's postulates.

Molecular diagnosis and prevalence of Potyvirus and Begomovirus.

RT-PCR detected a 100% prevalence of one member of the Potyvirus genus in the samples analyzed (20/20). The 350-bp amplicon for universal primers Nib2F and Nib3R was amplified in all 12 genotypes of *P. vulgaris* samples. The concentration and purity thresholds ranged from 127.7 - 482.3 ng μL^{-1} and 1.88 - 2.18 nm, respectively. Sequencing of five representative samples identified *Bean common mosaic virus* (BCMV) specie at 99 - 100% homology with the NCBI accessions MH024841.1 BCMV-3PF and MK069985.1 BCMV-CJ16 of this virus. The phylogenetic construction using Maximum Likelihood, reached 100% node support (Figure 3B). Reference sequences of *Papaya ringspot virus* (PRSV), specie of the Potyvirus genus, and *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), belonging to Begomovirus genus, were separated of the main clade. BCMV confirmatory sequences in this paper were recorded in GenBank with accession numbers OL229871.1, OL229872.1, OL229873.1, OL229874.1, and OL229875.1.

The high incidence of this virus agreed with the 90.2 - 100% reports for Africa (Mwaipopo *et al.*,

therae (KC584179.1) y *Stemphylium amaranthi* (KU850503.1) estuvieron distantes del nodo principal de *A. alternata* (Figura 3A). Sin embargo, es necesario remarcar que *A. alternata* conforma un grupo evolutivo diverso (*Alternaria* sect. *alternaria*) con atributos morfológicos y moleculares con ITS que pueden traslaparse entre especies, por lo que podrían requerirse estudios complementarios (Armitage *et al.*, 2020).

Pruebas de patogenicidad de *Alternaria alternata*.

La patogenicidad de *A. alternata* se comprobó en tejido foliar de *P. vulgaris* genotipo *Tipo Flor de Mayo* con las cepas FPTA2h, FPTA3h y FPTA4h. Los foliolos testigo no reprodujeron síntomas. En promedio, siete días después de la inoculación, el 100% de foliolos mostraron síntomas de lesiones necróticas café-oscuro o negras con halos amarillos. La validación por criterios de morfometría colonial, conidial y corroboración con claves taxonómicas (Simmons, 2007; Barnet y Hunter, 1998), fueron coincidentes con *Alternaria alternata* en el total de foliolos analizados confirmando los postulados de Koch.

Diagnóstico molecular y prevalencia de Potyvirus y Begomovirus.

Se detectó por RT-PCR una prevalencia del 100% de un miembro del género Potyvirus en las muestras analizadas (20/20). El amplicon de 350 pb para los iniciadores universales Nib2F y Nib3R amplificó en las muestras de los 12 genotipos de *P. vulgaris*. Los umbrales concentración y pureza estuvieron en rango de 127.7 - 482.3 ng μL^{-1} y 1.88 - 2.18 nm, respectivamente. La secuenciación de cinco muestras representativas determinó la identificación de la especie *Bean common mosaic virus* (BCMV) con 99 - 100% de homología con las accesiones MH024841.1 BCMV-3PF y MK069985.1 BCMV-CJ16 de NCBI para este virus. La reconstrucción filogenética por Maximum Likelihood, tuvo 100% soporte de nodo

2018), although it exceeded that reported previously by Lepe-Soltero *et al.* (2012) in Sonora and Nayarit (6 - 78%). In this study, BCMV symptoms were mosaic (100%), epinasty (60%), and leaf distortion (39%), which were apparently influenced by the genotype (Figure 3B). The BCMNV was not detected, a Potyvirus closely related to BCMV, previously reported with higher prevalence in five Mexican states, State of Mexico not included, occurring in single infection or mixed with BCMV (Lepe-Soltero *et al.*, 2012). Even though necrosis symptoms on secondary veins, typical of BCMNV, were not detected in this research, future studies may require specific primers, in addition to a universal sequence, to ensure the diagnosis.

The 18 samples with severe leaf yellowing suspected of some member of Begomovirus genus were not amplified with PBL1v2040 and PCR1c universal primers, despite the presence, although in low density of *B. tabaci* in over 80% of 12 genotypes. This insect represents a potential vector of this virus group. However, this finding was unexpected considering that *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) and *Bean golden mosaic virus* (BGMV) have been widely reported for Central America and the Caribbean (Rojas *et al.*, 2018; 1993), although strongly associated with regional outbreaks of *Bemisia tabaci* in the 1990s (Gilbertson *et al.*, 2005). In Brazil, BGMV was reported infecting seven bean cultivars, though at different viral concentrations (De Freitas-Vanzo *et al.*, 2021).

Bean common mosaic virus severity in 12 bean genotypes. The epidemiological matrix for comparative analysis among genotypes regarding *A. alternata* and BCMV severity, and spatial spread, included 22 variables, 859 observations, and 18898 metadata. In flowering phase, BCMV plant severity varied between 9 and 50% (classes

(Figura 3B). Secuencias de referencia asociadas a *Papaya ringspot virus* (PRSV) especie del género Potyvirus y principalmente el *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) perteneciente a los Begomovirus se ubicaron distantes del clado principal. Las secuencias confirmatorias de BCMV en este trabajo se registraron en GenBank con los números de accesión OL229871.1, OL229872.1, OL229873.1, OL229874.1 y OL229875.1.

La alta incidencia de este virus fue coincidente con reportes de 90.2 - 100% para África (Mwai-popo *et al.*, 2018), pero superó los reportados previamente por Lepe-Soltero y colaboradores (2012) para Sonora y Nayarit con un rango de 6 - 78%. En este estudio, la prevalencia de síntomas asociados a BCMV fueron mosaico (100%), epinastia (60%) y distorsión foliar (39%), posiblemente dependiente del genotipo (Figura 3B). No se detectó la presencia del BCMNV, un Potyvirus muy relacionado con BCMV, previamente reportado en cinco estados mexicanos, Estado de México no incluido, con mayor prevalencia en infecciones simples, o mezclado con BCMV (Lepe-Soltero *et al.*, 2012). Aunque en campo no se detectó síntomas de necrosis en nervaduras secundarias, típico del BCMNV, futuros trabajos podrían requerir iniciadores específicos, en adición al universal, para asegurar el diagnóstico.

Las 18 muestras con fuerte amarillamiento foliar presuntivas a algún miembro del género Begomovirus no amplificaron con los iniciadores universales PBL1v2040 y PCR1c, a pesar de presencia, aunque con muy baja densidad, de *B. tabaci* en más de 80% de los 12 genotipos. Este insecto es un potencial vector de este grupo de virus. Este resultado fue inesperado ya que el *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) y *Bean golden mosaic virus* (BGMV) se han reportado ampliamente para Centroamérica y el Caribe (Rojas *et al.*, 2018; 1993), aunque fuertemente asociado con los brotes regionales de *Bemisia tabaci* en los 90's (Gilbert-

3 - 5) with high genotype-dependent variability. *Vaquita Negro* (50.06 ± 13.6), *Canario* (48.7 ± 15.4), and *Segregante Oti* (40.14 ± 21.9) exhibited higher symptom expressions severity classes 4 - 5 compared to other genotypes (Tukey, $p = 0.05$) (Table 2). On the contrary, *Bayo Mecentral* (21.2 ± 8.1), *Tipo Flor de Mayo* (18.2 ± 14.8) and *Negro Perla* (9.6 ± 6.9) exhibited relatively lower severity (classes 3 - 4) (Tukey, $p = 0.05$) (Table 2). At fruit stage, severity range increased to 6.7 - 58.1% (classes 3 - 6). *Vaquita Negro* (58.1 ± 4.8) and *Canario* (37.3 ± 20.3) were statistically the most susceptible genotypes with severity classes 4 - 5 (Tukey, $p = 0.05$), whereas *Garrapato* (38.5 ± 18.5) which increased in severity by 14%, was statistically different (t -test, $p < 0.0001$) respect to the flowering stage.

son *et al.*, 2005). En Brasil, el BGMV fue infectivo en siete cultivares de frijol, aunque con diferentes concentraciones virales (De Freitas-Vanzo *et al.*, 2021).

Severidad de *Bean common mosaic virus* en 12 genotipos de frijol. La matriz epidemiológica para el análisis comparativo entre genotipos respecto a la severidad de *Alternaria alternata* y BCMV, y la dispersión espacial, incluyó 22 variables, 859 observaciones y 18898 metadatos. En fase de floración de *P. vulgaris*, la severidad de BCMV en planta osciló entre 9 y 50% (clases 3 - 5), con alta variabilidad en función del genotipo. *Vaquita Negro* (50.06 ± 13.6), *Canario* (48.7 ± 15.4) y *Segregante Oti* (40.14 ± 21.9) mostraron mayor expresión de síntomas con clases de severidad 4 - 5 estadísticamente

Table 2. BCMV and *A. alternata* average severity percentage in 12 bean genotypes (*P. vulgaris*) on flowering and fruit stage under field conditions. Spring-Summer 2020 season.

Cuadro 2. Porcentaje de severidad promedio de BCMV y *A. alternata* en 12 genotipos de frijol (*P. vulgaris*) en la fase fenológica de floración y fructificación en condiciones de campo. Ciclo Primavera-Verano, 2020.

| Genotipo ^y | <i>Bean common mosaic virus</i> | | | <i>Alternaria alternata</i> | | |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------|
| | Floración | Fructificación | t -test ^x | Floración | Fructificación | t -test ^x |
| <i>Vaquita Negro</i> | 50.0 ± 13.6 a | 58.1 ± 4.8 a | 0.021 | 10.6 ± 10.6 b | 11.9 ± 6.0 b | 0.581 |
| <i>Canario</i> | 48.7 ± 15.4 a | 37.3 ± 20.3 abc | 0.000 | 7.0 ± 7.5 b | 42.7 ± 18.2 a | 0.000 |
| <i>Segregante Oti</i> | 40.1 ± 21.9 ab | 31.0 ± 16.4 abc | 0.039 | 6.8 ± 9.4 b | 8.6 ± 6.6 b | 0.424 |
| <i>Flor de Mayo</i> | 36.0 ± 15.4 abc | 29.8 ± 18.8 abc | 0.123 | 11.4 ± 10.1 b | 11.9 ± 9.2 b | 0.870 |
| <i>Negro Mixteco</i> | 31.5 ± 15.8 abc | 12.1 ± 12.3 bc | 0.000 | 16.7 ± 10.3 ab | 7.5 ± 4.2 b | 0.001 |
| <i>Negro Querétaro</i> | 29.9 ± 8.1 abc | 15.2 ± 12.4 bc | 0.000 | 15.3 ± 11.9 ab | 10.0 ± 10.8 b | 0.119 |
| <i>Garrapato</i> | 24.5 ± 19.1 abc | 38.5 ± 18.5 ab | 0.000 | 5.3 ± 4.3 b | 20.2 ± 8.6 b | 0.000 |
| <i>Pinto Texcoco</i> | 23.4 ± 10.5 abc | 16.0 ± 10.0 bc | 0.051 | 33.6 ± 8.1 a | 9.5 ± 4.8 b | 0.000 |
| <i>Oti</i> | 23.3 ± 21.0 abc | 29.7 ± 17.8 abc | 0.102 | 5.6 ± 7.4 b | 15.2 ± 7.4 b | 0.000 |
| <i>Bayo Mecentral</i> | 21.2 ± 8.1 abc | 9.5 ± 4.2 bc | 0.000 | 11.8 ± 7.4 b | 12.3 ± 3.4 b | 0.865 |
| <i>Tipo Flor de Mayo</i> | 18.2 ± 14.8 bc | 27.0 ± 22 bc | 0.042 | 9.9 ± 11.8 b | 41.4 ± 13 a | 0.000 |
| <i>Negro Perla</i> | 9.6 ± 6.9 c | 6.7 ± 8.8 c | 0.121 | 10.0 ± 10.6 b | 6.2 ± 5.8 b | 0.111 |

^x Student's t -test ($\alpha = 0.05$) comparing mean percent BCMV severity in plant canopy and *A. alternata* foliar severity between flowering and fruiting. Treatments with at least a common letter are statistically equal ANOVA/Tukey $p = 0.05$. Bold numbers represent the genotypes with the maximum and minimum severity values of BCMV and *A. alternata*. Signs ± followed by a number represents the *intra*-genotype standard deviation (SD) of mean percent severity. / ^x Prueba t -Student ($\alpha = 0.05$) comparando el promedio del porcentaje de severidad de BCMV en dosel de planta y severidad foliar de *A. alternata* entre floración y fructificación. Tratamientos con al menos una letra en común son estadísticamente iguales ANOVA/Tukey $p = 0.05$. Números en negrita representan genotipos con los valores de severidad máximos y mínimos de BCMV y *A. alternata*. Signos ± seguido de un número representa la desviación estándar (SD) *intra*-genotipo de la media porcentual de severidad.

^y Bold genotypes belong to the same lineage. / ^y Genotipos en negrita pertenecen al mismo linaje.

Negro Perla (6.7 ± 8.8) was the lowest susceptible genotype at flowering and fruit stage without statistical differences (t -test, $p = 0.12$) (Table 2). However, the trend was a reduction between 2.9 - 19.9% severity, attributed to vegetative growth, previously documented in Kenya for *pre*- and *post*-rainfall experiments, where severity decreased up to 12.6% in ten *P. vulgaris* cultivars (Mangeni *et al.*, 2020). In this research, eight genotypes showed the decreasing condition, of which six were statistically different (t -test, $p = 0.0001$). Severity for *Flor de Mayo* (- 6.4%) and *Negro Perla* (- 2.9%) was no statistical different in flowering and fruit stage (t -test, $p = 0.12$) (Table 2). Among the most susceptible genotypes, those with statistically significant increases (6.4 - 8.8%) (t -test, $p = 0.021 - 0.042$) were *Vaquita Negro* (58.1 ± 4.8) and *Tipo Flor de Mayo* (27 ± 22) (Table 2).

Overall, varietal studies of bean virus severity (Potyvirus, Begomovirus, or another genus) use qualitative leaf-level scales (e.g., 0 = no symptoms, 1 = mild symptoms, 2 = moderate symptoms, and 3 = severe distortion, leaf or stem malformation, and stunting). Using this scale, Mangeni and coworkers (2020) reported a 2.3 average severity of BCMV, which could be comparative to classes 4 - 5 of the severity scale developed for this study, found in *Vaquita Negro*, *Canario*, *Garrapato*, or *Segregate Oti* (Table 2). Murere and coworkers (2018) studying 16 bean genotypes reported BCMV prevalence in 29.4 - 42.78% cultivars with a regional average severity of 1.1 - 1.67. Susceptible genotypes exhibited moderate and severe symptoms (classes 2 - 3).

Regarding disease intensity caused by Begomoviruses (i.e., CuLCrV and SiGMFV) in *Phaseolus* sp., severity has been reported between 5 - 50% in 20 genotypes considered of moderate resistance, and over 60% for 21 varieties typified as susceptible (Agarwal *et al.*, 2021). These findings

diferentes (Tukey, $p = 0.05$) al resto de genotipos (Cuadro 2). Por el contrario, *Bayo Mecentral* (21.2 ± 8.1), *Tipo Flor de Mayo* (18.2 ± 14.8) y *Negro Perla* (9.6 ± 6.9) tuvieron severidad relativamente más baja (clases 3 - 4), entre las cuales *Negro Perla* fue estadísticamente menor (Tukey, $p = 0.05$) (Cuadro 2). En fase de fructificación, se amplió el rango de severidad a 6.7 - 58.1% (clases 3 - 6). *Vaquita Negro* (58.1 ± 4.8) y *Canario* (37.3 ± 20.3) se mantuvieron estadísticamente como genotipos más susceptibles con clases de severidad 4 - 5 (Tukey, $p = 0.05$), mientras que *Garrapato* (38.5 ± 18.5) tuvo un incremento de severidad en 14%, estadísticamente diferente (t -test, $p < 0.0001$) respecto a la expresión sintomática en floración.

Negro Perla (6.7 ± 8.8) fue el genotipo menos susceptible en floración y fructificación sin diferencias estadísticas entre estos eventos fenológicos (t -test, $p = 0.121$) (Cuadro 2). Sin embargo, la tendencia fue una reducción entre 2.9 - 19.9% de severidad, atribuida al desarrollo vegetativo, ya documentado en otro trabajo en Kenia en experimentos *pre*- y *post*-lluvias, con decrementos hasta de 12.6% en 10 cultivares de *P. vulgaris* (Mangeni *et al.*, 2020). En esta investigación, un total de ocho genotipos presentaron esta condición decreciente, de los cuales seis fueron estadísticamente diferentes (t -test, $p = 0.0001$). *Flor de Mayo* (-6.4%) y *Negro Perla* (-2.9%) no presentaron diferencias de severidad entre floración y fructificación (t -test, $p = 0.12$) (Cuadro 2). Entre los genotipos más susceptibles, los que tuvieron incrementos (6.4 - 8.8%) estadísticamente significativos (t -test, $p = 0.021 - 0.042$) fueron *Vaquita negro* (58.1 ± 4.8) y *Tipo Flor de Mayo* (27 ± 22) (Cuadro 2).

En general, los estudios varietales de frijol respecto a la severidad de virus (Potyvirus, Begomovirus u otros géneros) emplean escalas cualitativas a nivel foliar (p.e., 0 = sin síntomas, 1 = síntomas leves, 2 = síntomas moderados y 3 = distorsión

show the high prevalence and severity of BCMV and other virus species on beans, suggesting the need of updating the viruses status in Mexican germplasm stocks and the productive implications (Flores-Estévez *et al.*, 2003; Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012). The use of a 70 cm row-section plant-coverage as scale proposed in this work allowed discriminating the viral infectious effect and therefore constitutes a methodological alternative for intensive field studies with respect to plant-level scales under the rationale of confounding canopy in high density plantings.

***Alternaria alternata* severity in 12 bean genotypes.**

Among the 12 bean genotypes studied, *A. alternata* severity was highly variable. In the flowering stage, leaf severity ranged from 7 - 33.6% (classes 3 - 4). *Pinto Texcoco* was the most susceptible genotype (33.6 ± 8.1), followed by *Negro Mixteco* (16.7 ± 10.3) and *Negro Querétaro* (15.3 ± 11.9). However, these genotypes were no statistically different (Tukey, $p = 0.05$) due to *intra*- and *inter*-genotype variability (Table 2). *Garrapato* (5.3 ± 4.3), *Oti* (5.6 ± 7.4), and *Segregante Oti* (6.8 ± 9.4), belonging to the same lineage (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), exhibited tolerance to the fungus. These materials were equal statistically (Tukey, $p = 0.05$) respect to the other genotypes except for *Pinto Texcoco* (Table 2). This lineage was reported as highly or moderately resistant to foliar and root fungal infections such as *Colleotrichum lindemuthianum*, *Sclerotinia* sp., *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* and *Rhizoctonia solani* (Estrada-Gómez *et al.*, 2004).

At the fruit stage, severity maintained its variability. Nevertheless, *Canario* (42.7 ± 18.2) and *Tipo Flor de Mayo* (41.4 ± 13) were the most susceptible genotypes showing significant increases compared to the flowering stage with

severa, malformación de las hojas o del tallo y retraso en el crecimiento). Con esta escala, Mangeni y colaboradores (2020), reportaron 2.3 severidad promedio de BCMV, el cual puede considerarse equivalente a las clases 4 - 5 de la escala de severidad desarrollada en este estudio y encontradas en *Vaquita Negro*, *Canario*, *Garrapato* o *Segregante Oti* (Cuadro 2). Murere y colaboradores (2018) en un estudio de 16 genotipos de frijol reportaron prevalencia de BCMV en 29.4 - 42.78% de las muestras analizadas con rango de severidad promedio regional de 1.1 - 1.67 (escala 0 - 3). Los genotipos susceptibles exhibieron síntomas moderados y severos (clases 2 - 3).

Respecto a la intensidad de enfermedad causada por Begomovirus (i.e., CuLCrV y SiGMFV) en *Phaseolus* sp., la severidad se ha reportado entre 5 - 50% en 20 genotipos considerados con moderada resistencia, y más de 60% en 21 variedades tipificadas como susceptibles (Agarwal *et al.*, 2021). Estos resultados muestran la alta prevalencia e intensidad de daño de BCMV y otras especies de virus en frijol y sugieren la importancia de actualizar su estatus en los acervos genéticos mexicanos y su implicación productiva (Flores-Estévez *et al.*, 2003; Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012). El empleo de la escala de cobertura vegetal propuesta en este trabajo permitió discriminar el efecto infeccioso viral por lo que constituye una alternativa metodológica para estudios intensivos de campo respecto a escalas a nivel planta bajo la racionalidad de dosel confundido entre plantas de siembras compacta.

Severidad de *Alternaria alternata* en 12 genotipos de frijol.

La severidad de *A. alternata* fue contrastante entre los 12 genotipos de frijol estudiados. En fase de floración, la severidad foliar osciló entre 7 - 33.6% (clases 3 - 4). *Pinto Texcoco* fue el genotipo más susceptible (33.6 ± 8.1), seguido

35.7% and 31.5% (t -test, $p < 0.0001$), respectively (Table 2). This increase is explained by greater plant longevity, favoring leaf growth and prolongation of infection cycles. The genotypes *Negro Perla* (6.2 ± 5.8), *Negro Mixteco* (7.5 ± 4.2), *Segregante Oti* (8.6 ± 6.6), *Pinto Texcoco* (9.5 ± 4.8), and *Negro Querétaro* (10 ± 10.8) exhibited lower severity than 10% (Classes 1 - 3), and a significant decrease severity, from 3.8 - 24.1%, respect to the flowering stage (t -test, $p < 0.01$) (Table 2). *Pinto Texcoco* exhibited the highest severity reduction from 33.6% to 9.5%, followed by *Negro Mixteco* decreased by 16.7%. Analogous to BCMV, the severity decrease in these genotypes was associated with tissue senescence and consequently inoculum loss. *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Vaquita Negro*, and *Segregante Oti* were the most stable genotypes, with moderate severity of 6.8 - 11.8% in the flowering stage, and not significant increases, between 0.4 - 1.8%, in the fruit stage (t -test, $p = 0.42 - 0.87$) (Table 2).

Several *Alternaria* spp. species has been reported associated with beans and other crops. i.e., *A. solani* in some species of the Solanaceae family can be highly restrictive for production (Thomma, 2003). *Alternaria alternata* (= *A. tenuis*) was reported as a pathogenic agent on *Phaseolus* spp. at least since the early 19th century (Thomma, 2003; O'Donnell and Dickinson, 1980). Nevertheless, epidemiological studies of *A. alternata* applied to *P. vulgaris* germplasm assessment were not found. This report is the first in Mexico with this approach.

Integrated Damage Index (IDI) and Vigor Index (IV). Comprehensive health of *P. vulgaris* genotypes regarding BCMV and *A. alternata*, estimated by IDI, ranged from 0 - 1.54. The IDI was higher at flowering stage between 0.37 - 1.51, being *Oti* (0.37) and *Negro Perla* (0.43) significantly more tolerant genotypes, whereas *Vaquita Negro*

contrastantemente de *Negro Mixteco* (16.7 ± 10.3) y *Negro Querétaro* (15.3 ± 11.9). Sin embargo, estos genotipos fueron estadísticamente iguales (Tukey, $p = 0.05$) debido a la variabilidad *intra-* e *inter-*genotipos (Cuadro 2). *Garrapato* (5.3 ± 4.3), *Oti* (5.6 ± 7.4) y *Segregante Oti* (6.8 ± 9.4), pertenecientes al mismo linaje (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), fueron relativamente más tolerantes al hongo. Estadísticamente (Tukey, $p = 0.05$), estos materiales no fueron diferentes del resto de genotipos con excepción de *Pinto Texcoco* (Cuadro 2). Este linaje se ha reportado con alta o moderada resistencia a infecciones de hongos foliares y de raíz como *Colleotrichum lindemuthianum*, *Sclerotinia* sp., *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* y *Rhizoctonia solani* (Estrada-Gómez *et al.*, 2004).

En fructificación, la severidad se mantuvo con alta variabilidad. No obstante, *Canario* (42.7 ± 18.2) y *Tipo Flor de Mayo* (41.4 ± 13) fueron genotipos altamente susceptibles con incrementos significativos respecto a la fase de floración (t -test, $p < 0.0001$) con 35.7% y 31.5%, respectivamente (Cuadro 2). Este incremento se puede explicar por mayor longevidad del genotipo propiciando renovación foliar y extensión del proceso infeccioso. Los genotipos *Negro Perla* (6.2 ± 5.8), *Negro Mixteco* (7.5 ± 4.2), *Segregante Oti* (8.6 ± 6.6), *Pinto Texcoco* (9.5 ± 4.8) y *Negro Querétaro* (10 ± 10.8) tuvieron severidad menor al 10% (Clases 1 - 3), con una reducción significativa (t -test, $p < 0.01$) de 3.8 - 24.1% respecto al daño expresado en floración (Cuadro 2). *Pinto Texcoco* exhibió la mayor reducción de severidad pasando de 33.6% a 9.5%, seguido de *Negro Mixteco* con un decremento de 16.7%. Análogo a BCMV, en estos genotipos la disminución de severidad se asoció a senescencia de tejidos y consecuentemente pérdida de inóculo. Los genotipos más estables fueron *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Vaquita Negro* y *Segregante Oti*, los cuales tuvieron severidad moderada 6.8 - 11.8% en

(1.51) and *Segregante Oti* (1.05) were the most susceptible to BCMV and *A. alternata* combined effect (Tukey, $p = 0.05$) (Table 3). In fruit phase, the IDI decreased considerably to ranges of 0.03 - 0.63. Once again, *Negro Perla* (0.03) and *Oti* (0.03) were statistically the most tolerant, and *Vaquita Negro* (0.63) was the most susceptible (Tukey, $p = 0.05$) (Table 3).

The *Vigor Index* (IV) by genotype ranged from 0.1 - 0.91. This index was inversely proportional to IDI, evidencing a strongly detrimental physiological effect of the BCMV and *A. alternata* combination. Overall, IV showed statistical differences at least in 8/12 genotypes (Tukey, $p = 0.05$). *Oti* (0.91) had significantly higher coverage-plant vigor (Tukey, $p = 0.05$). Interestingly, *Garrapato*, from whom *Oti* was derived, and was selected for Mexico State Valley due to high productivity and resistance to plant pathogenic fungi (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), exhibited moderate IV = 0.64 (Table 3), and moderate susceptibility with 38% maximum damage by BCMV and 20.2% *A. alternata* (Table 2). By contrast, *Vaquita Negro* (0.1) showed the lowest vigor, indicating high susceptibility, particularly to BCMV. *Negro Querétaro*, *Bayo Mecentral*, *Negro Mixteco* and *Segregante Oti* were similar genotypes in IV, ranged from 0.43 - 0.48 (Tukey, $p = 0.05$) (Table 3).

This research supports *Oti* and *Negro Perla* as the genotypes with the highest tolerance to BCMV and *A. alternata*, attributed to intrinsic genotype-environment characteristics. However, it is necessary to analyze lineages and parental lines to optimize this type of studies in comprehensive breeding programs that incorporate phytosanitary factors in addition to the phenotypic approach associated with yield components.

Spatial analysis of severity at genotype level. Geostatistical kriging analysis and omnidirectional

Table 3. *Vigor Index* (IV) in flowering phase and *Integrated Damage Index* (IDI) in flowering and fruit stages assessed in 12 varieties of bean (*P. vulgaris*) under field conditions. Spring-Summer 2020 season.

Cuadro 3. *Índice de Vigor* (IV) en estado de floración e *Índice de Daño Integrado* (IDI) en floración y fructificación evaluados en 12 variedades de frijol (*P. vulgaris*) en condiciones de campo. Ciclo Primavera-Verano 2020.

| Variedad ^y | IV ^x | IDI ^y
Floración | IDI ^z
Fructificación |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------------|
| <i>Oti</i> | 0.91 a | 0.37 f | 0.03 c |
| <i>Negro Perla</i> | 0.71 b | 0.43 ef | 0.03 c |
| <i>Canario</i> | 0.68 c | 0.90 bcd | 0.18 b |
| <i>Flor de Mayo</i> | 0.66 d | 0.79 bcd | 0.13 bc |
| <i>Garrapato</i> | 0.64 e | 0.66 def | 0.18 b |
| <i>Pinto Texcoco</i> | 0.61 f | 0.78 bcd | 0.08 bc |
| <i>Tipo Flor de Mayo</i> | 0.53 g | 0.71 cde | 0.21 b |
| <i>Negro Querétaro</i> | 0.48 h | 0.91 bcd | 0.10 bc |
| <i>Bayo Mecentral</i> | 0.47 hi | 0.81 bcd | 0.08 bc |
| <i>Negro Mixteco</i> | 0.45 ij | 0.97 bc | 0.09 bc |
| <i>Segregante Oti</i> | 0.43 j | 1.05 b | 0.22 b |
| <i>Vaquita Negro</i> | 0.10 k | 1.51 a | 0.63 a |

^x Treatments with at least one common letter are statistically equal by Tukey $p = 0.05$. ^y Tratamientos con al menos una letra en común son estadísticamente iguales por Tukey $p = 0.05$.

^y Genotypes and IV and IDI values in bold represent maximum and minimum contrasts. High IV and low IDI values indicate higher tolerance to BCMV and *A. alternata*. / ^z Genotipos y valores IV e IDI en negritas representan contrastes máximo y mínimo. Alto valor IV y bajo IDI indican mayor tolerancia a BCMV y *A. alternata*.

floración, con incrementos no significativos entre 0.4 - 1.8% en fructificación (t -test, $p = 0.42 - 0.87$) (Cuadro 2).

Diversas especies de *Alternaria* spp. se han reportado asociados al frijol y otros cultivos. En algunos casos, como *A. solani* en solanáceas puede ser altamente restrictivo para la producción (Thomma, 2003). *Alternaria alternata* (= *A. tenuis*) se ha reportado como agente patogénico en *Phaseolus* spp. al menos desde principios del siglo XIX (Thomma, 2003; O'Donnell y Dickinson, 1980). Sin embargo, no se encontraron estudios epidemiológicos aplicados a la evaluación de germoplasma respecto a *A.*

variograms of *Bean common mosaic virus* and *A. alternata* exhibited random *intra*-genotype dispersal patterns of random *foci*, aggregates, and uniformity depending on susceptibility / tolerance and phenological phase. Aggregation intensity agreed with severity intensity / genotype, IDI, and IV results discussed in previous sections (Table 2, 3; Figure 1, 4).

The *Vaquita Negro* block, the most susceptible genotype to BCMV, was characterized by high-intensity dispersion (class 5, 58.2%) at fruit stage (Figure 4A), without spatial dependence of severity indicating uniform virus infection distribution through the parameters' $nugget[n] = 209$, $\sigma^2\text{-parcial}[\sigma^2\text{-}p] \approx 0$, $\sigma^2\text{-sill}[\sigma^2\text{-}s] = 233.7$ (Figure 4B-**B11**). On the contrary, *Bayo Mecentral*, although had a *uniform* distribution ($n = 40.9$, $\sigma^2\text{-}p \approx 0$, $\sigma^2\text{-}s = 70.5$) was associated with low severity (class 3, 9.6%) (Figure 4A, 4B-**B1**).

Segregante Oti represented genotypes with spatial dependence in *discontinuous aggregate foci* of 4-8 distances of 70 cm row-sections ($n = 207.4$, $\sigma^2\text{-}p = 338.6$, $\sigma^2\text{-}s = 546$) (Figure 4A, 4B-**B12**), analogous to *Tipo Flor de Mayo* and *Negro Mixteco*, or block-edge effect, as *Canario*, *Flor de Mayo*, *Garrapato*, and *Oti* genotype (Figure 4A, 4B). Other group included *Negro Querétaro* with *random foci* ($n = 136$, $\sigma^2\text{-}p > 207.8$, $\sigma^2\text{-}s = 343.8$) (Figure 4A, 4B-**B7**), similar to *Bayo Mecentral*, *Pinto Texcoco* and *Negro Perla*, this last one significantly tolerant for both phenological stages (Figure 4A, 4B). Uniform dispersal pattern associated with BCMV, without statistical differences between phenological events (data not shown), suggests a seed-borne transmission effect, which is well established for this virus (Worrall *et al.*, 2015; Subramanya, 2013). However, a vector(s) may also be involved due to random foci and edge-block effect. *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*, among other aphids, have been reported as vectors (Worrall *et al.*, 2015).

alternata en *P. vulgaris*. Este es el primer reporte con ese enfoque en México.

Índice de Daño Integrado (IDI) e Índice de Vigor (IV). La sanidad integral de *Phaseolus vulgaris* respecto a BCMV y *A. alternata*, estimada con IDI, estuvo en el rango de 0 – 1.54. IDI fue mayor en floración con valores entre 0.37 – 1.51, siendo *Oti* (0.37) y *Negro Perla* (0.43) los genotipos significativamente más tolerantes, mientras que *Vaquita Negro* (1.51) y *Segregante Oti* (1.05) los más susceptibles considerando al efecto combinado de BCMV y *A. alternata* (Tukey, $p = 0.05$) (Cuadro 3). En fructificación, el IDI disminuyó considerablemente a rangos de 0.03 – 0.63. Nuevamente, *Negro Perla* (0.03) y *Oti* (0.03) fueron estadísticamente los más tolerantes, y *Vaquita Negro* (0.63) se mantuvo como el más susceptible (Tukey, $p = 0.05$) (Cuadro 3).

El *Índice de Vigor* de planta (IV) por genotipo osciló entre 0.1 – 0.91. Este índice fue inversamente proporcional a IDI, evidenciando fuerte efecto fisiológico detrimental de la combinación de BCMV y *A. alternata*. En general, el IV mostró diferencias estadísticas al menos en 8/12 genotipos (Tukey, $p = 0.05$). *Oti* (0.91) tuvo el vigor de planta significativamente más alto (Tukey, $p = 0.05$). Interesantemente, *Garrapato*, del cual se derivó *Oti*, y que fue seleccionado para el Valle de México por su alta productividad y resistencia a hongos fitopatógenos (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), tuvo moderado IV = 0.64 (Cuadro 3), y moderada susceptibilidad con daños máximos de 38% por BCMV y 20.2% por *A. alternata* (Cuadro 2). En contraste, *Vaquita Negro* (0.1) obtuvo el menor vigor, evidenciando su alta susceptibilidad principalmente a BCMV. *Negro Querétaro*, *Bayo Mecentral*, *Negro Mixteco* y *Segregante Oti* fueron genotipos similares en IV con rangos entre 0.43 – 0.48 (Tukey, $p = 0.05$) (Cuadro 3).

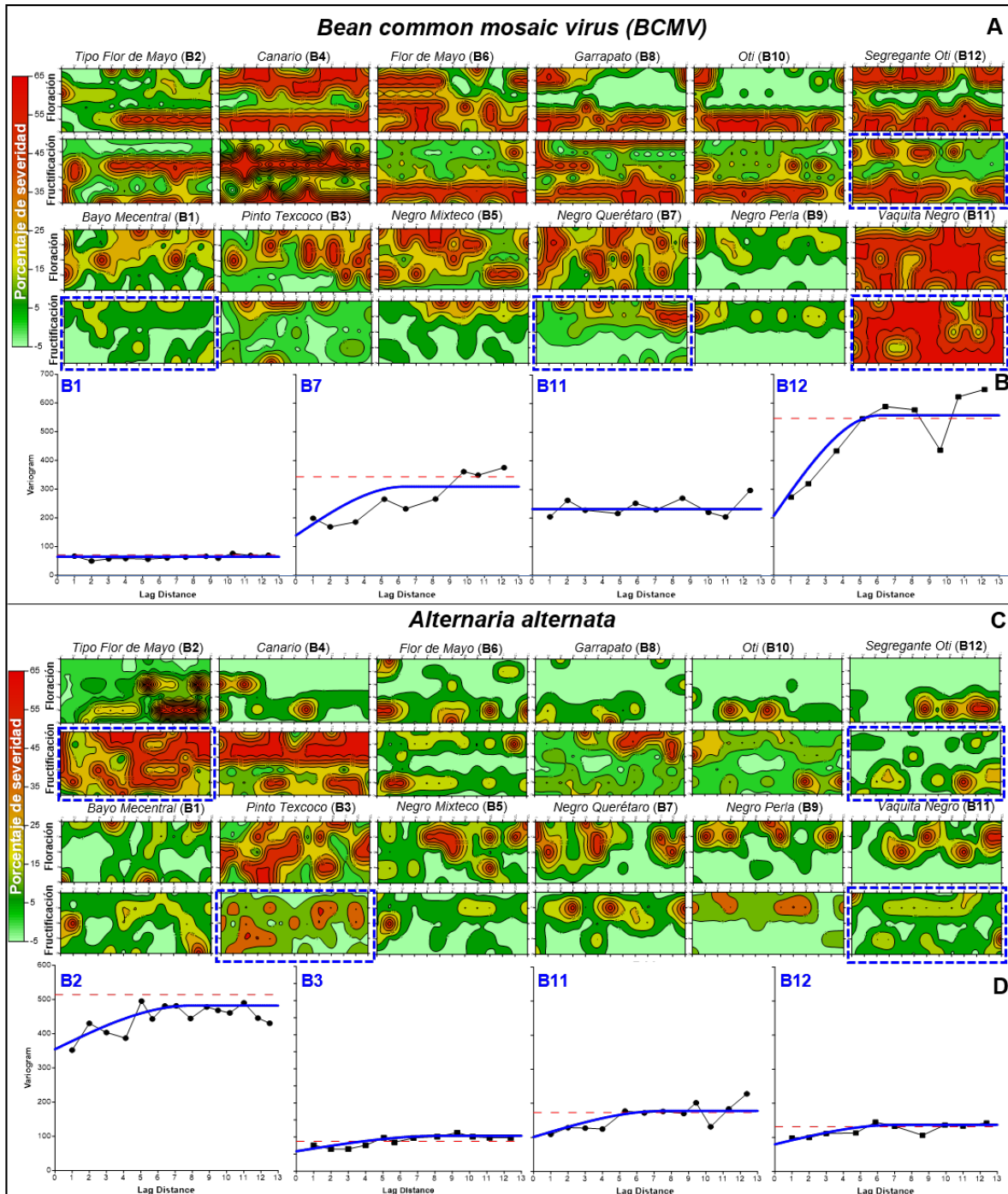


Figure 4. Geostatistical kriging analysis of average severity of A) *Bean common mosaic virus* and C) *Alternaria alternata* assessed in flowering (6 June, 2020) and fruiting (10 August, 2020) phase for 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes. Percentage severity is represented in green-red colorimetry according to assessment scale classes (Figure 1). Omnidirectional semivariograms by spherical method for contrasting genotype block, highlighted with blue dashes boxes, for B) BCMV (B1, B7, B11, and B12) and D) *A. alternata* (B2, B3, B11, and B12) in fruiting phase. The X-axis represents lag -distance of 70 cm row-sections (BCMV), -plant (*A. alternata*), and Y severity variance (σ^2).

Figura 4. Análisis geoestadístico kriging del promedio de severidad de: A) *Bean common mosaic virus* y C) *Alternaria alternata* evaluada en floración (6 junio, 2020) y fructificación (10 agosto, 2020) para 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*. El porcentaje de severidad se representa en colorimetría verde-rojo en concordancia con clases de escala de evaluación (Figura 1). Semivariogramas omnidireccionales por método esférico para bloque de genotipos contrastantes, remarcados con recuadros azules, para B) BCMV (B1, B7, B11 y B12) y D) *A. alternata* (B2, B3, B11 y B12) en fase de fructificación. Eje-X se representa *lag*-distancia de 70 cm sección de surco (BCMV), -planta (*A. alternata*), y Y la varianza (σ^2) de severidad.

Even though aphid colonization or exuviae were not detected in the flowering and fruit stages, a transient occurrence at early crop stages cannot be rule out. The primary inoculum may originate from diseased plants due to infected seeds, subsequently dispersed by vectors generating foci and aggregates with higher spatial dependence. The severity and incidence levels, contrasted with the phenological events studied, suggest that viral load and infection proportion in seeds is variable among genotypes. Viral transmission may have implications for breeding programs and BCMV resistance studies; therefore, should be investigated.

A. alternata spatial behavior also exhibited contagion progress, although less intense among genotypes, except for *Flor de Mayo* and *Canario* genotypes, which, due to higher susceptibility, showed spatial dependence in *discontinuous aggregates* of 3-8 plants ($n= 354.3$, $\sigma^2-p = 159.8$, $\sigma^2-s = 514.1$). These genotypes had high severity (class 4, 41.5%) at the fruit stage, coinciding with a significant increase and foci coalescence (Figure 4C-B2, B4, 4D-**B2**). *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro*, and *Segregante Oti* showed spatial dependence in small random foci of 2-3 plants ($n= 103$, $\sigma^2-p = 28.8$, $\sigma^2-s = 87.1$), with severity reduction at fruit stage associated with senescence and leaf tissue loss (Figure 4C, 4D-**B12**). *Pinto Texcoco*, *Flor de Mayo*, or *Garrapato* represented genotypes with discontinuous aggregate dispersal pattern of 4-5 plants ($n= 58.3$, $\sigma^2-p > 72.9$, $\sigma^2-s = 131.2$) and moderate severity (Figure 4C, 4D-**B3**). *Vaquita Negro* had low severity with *uniform* dependence ($n= 102$, $\sigma^2-p \approx 0$, $\sigma^2-s = 172.8$),

Esta investigación sustenta a *Oti* y *Negro Perla* como los genotipos de frijol de mayor tolerancia a BCMV y *A. alternata*, atribuida a características intrínsecas al genotipo-ambiente. Sin embargo, es necesario analizar los linajes y líneas parentales para optimizar este tipo de estudios en programas de mejoramiento integrales que incorporen factores fitosanitarios en adición al enfoque fenotípico asociado a componentes de rendimiento.

Análisis espacial-parcelario de severidad a nivel genotipo. El análisis geoestadístico kriging y variogramas omnidireccionales del *Bean common mosaic virus* y *A. alternata* exhibieron patrones de dispersión *intra*-genotipo aleatorios de *focos*, agregados y uniformes en función de la susceptibilidad/tolerancia y evento fenológico. La intensidad de agregación fue concordante con los resultados de severidad/genotipo, IDI e IV analizados en secciones previas (Cuadro 2, 3; Figura 1, 4).

El bloque de *Vaquita Negro*, el genotipo más susceptible a BCMV, se caracterizó por dispersión de alta intensidad (clase 5, 58.2%) en fase de fructificación (Figura 4A), sin dependencia espacial de severidad indicando distribución *uniforme* de la infección del virus con parámetros variográficos $nugget[n]= 209$, $\sigma^2\text{-parcial}[\sigma^2-p] \approx 0$, $\sigma^2\text{-sill}[\sigma^2-s] = 233.7$ (Figura 4B-**B11**). Contrariamente, *Bayo Mecertral*, aunque tuvo una distribución *uniforme* ($n= 40.9$, $\sigma^2-p \approx 0$, $\sigma^2-s = 70.5$) pero asociado a baja intensidad de daño (clase 3, 9.6%) (Figura 4A, 4B-**B1**).

Segregante Oti fue representativo de genotipos con dependencia espacial en *focos agregados*

however, associated with low covered-plant vigor (0.1) as well as high susceptibility to BCMV (58.1%), therefore, it could be a competition effect rather than tolerance (Figure 4C, 4D-**B11**).

The microclimatic data recorded during the experiment showed *minimum* relative humidity (RH) between 22 - 51% and *RH-maximum* >77%; *minimum* temperature (T) of 11.6 - 15.8 °C and *T-maximum* of 21.6 - 28.9 °C, and discontinuous *post-flowering* and fruit rainfall frequency. These conditions are considered optimal for *A. alternata* mycelial growth and sporulation (Prasad and Ahir, 2013); thus, the dispersal patterns exhibited could represent the real fungus parasitic fitness conditioned by genotype. Consequently, the fungal epidemic potential will be strongly influenced by genetic factors and other contributing abiotic components (Table 4).

Abiotic effects associated with *A. alternata* infection on bean. Wind (*V*) and hail (*G*) damage simulation was associated with symptoms in 100% of the experimental leaflets, except for Soil (*S*) and the absolute control (Table 4). Necrotic lesions caused by inoculation of *A. alternata* isolate FPTA2h were reproduced (Figure 2B). Foliar disease severity was directly proportional to conidia concentration applied for each simulated factor. Overall, the *G* effect induced a higher severity, which ranged in 75.3 - 94.7%, in comparison to *V* with 66 - 95.7% (Tukey, $p = 0.05$). Treatments *V* and *G* at a 49000 conidia mL⁻¹ concentration (C3) induced 95.3% and 94.7% severity, respectively (Table 4; Figure 2B). Concentrations of 39000 (C2) and 20000 mL⁻¹ (C1) in *G* induced 80.3% and 75.3% severity, respectively, with not statistical differences (Tukey, $p = 0.05$). Treatments *V*-C1 and *V*-C2 induced a similar severity of 66% and 64.3%, respectively (Table 4; Figure 2B).

A biofilm of colonies, putatively associated with soil-borne pathogenic bacteria was found in *S*-Ci

discontinuos de 4-8 segmentos de 70 cm surco ($n=207.4$, $\sigma^2-p = 338.6$, $\sigma^2-s = 546$) (Figura 4A, 4B-**B12**), análogo a *Tipo Flor de Mayo* y *Negro Mixteco*, o con efecto de bordo, como en *Canario*, *Flor de Mayo*, *Garrapato* u *Oti* (Figura 4A, 4B). Por su parte, *Negro Querétaro* evidenció *focos aleatorios* ($n=136$, $\sigma^2-p > 207.8$, $\sigma^2-s = 343.8$) (Figura 4A, 4B-**B7**), cuyo patrón fue similar en *Bayo Mecentral*, *Pinto Texcoco* y *Negro Perla*, este último significativamente más tolerante en ambos eventos fenológicos (Figura 4A, 4B). El patrón de dispersión uniforme asociado a BCMV, sin diferencias estadísticas entre eventos fenológicos (datos no mostrados), sugiere efecto de transmisión por semilla, lo cual se tiene consignando para este virus (Worrall *et al.*, 2015; Subramanya, 2013). Sin embargo, un vector(es) también puede estar implicado por la presencia de focos aleatorios y de orilla-bloque. *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*, entre otros áfidos, se han reportado como vectores (Worrall *et al.*, 2015). Aunque colonización o exuvias de áfidos no fue detectada en las fases de floración y fructificación, no se descarta su ocurrencia transitoria en etapas tempranas del cultivo. El inóculo primario puede provenir de plantas enfermas a partir de semilla infectada, con posterior dispersión por el vector generando focos y agregados con mayor dependencia espacial. Los niveles de severidad e incidencia, contrastante en los eventos fenológicos estudiados, sugiere que la carga viral y proporción de infección en semilla es variable entre genotipos. La transmisión viral puede tener implicaciones en programas de mejoramiento genético y estudios de resistencia al BCMV por lo que debe ser investigado.

El comportamiento espacial de *A. alternata* también mostró una progresión de contagio aunque con claramente con menor intensidad entre genotipos, con excepción de *Tipo Flor de Mayo* y *Canario*, los cuales debido a su mayor susceptibilidad, evidenciaron dependencia espacial en *agregados discontinuos* de 3-8 plantas ($n=354.3$, $\sigma^2-p = 159.8$,

Table 4. Percentage of severity in detached bean leaflets of *Flor de Mayo* genotype (*P. vulgaris*), inoculated with three conidia concentrations (C) of *Alternaria alternata* isolate FPTA2h, previously damaged with simulated wind, hail and soil in controlled conditions.

Cuadro 4. Porcentaje de severidad en folíolos desprendidos de frijol variedad *Flor de Mayo* (*P. vulgaris*), inoculados con tres concentraciones de conidios (C) de *Alternaria alternata* cepa FPTA2h, previa simulación de daños por Viento, Granizo y Suelo en condiciones controladas.

| Tipo de Daño Simulado | Concentración (conidios mL ⁻¹) | Porcentaje ^x de Severidad (± Std. Dev) |
|-----------------------|--|---|
| Viento (V) | C1 (20,000) | 66.0 ± 4 d |
| | C2 (39,000) | 64.3 ± 8.5 d |
| | C3 (49,000) | 95.3 ± 3.5 a |
| Granizo (G) | C1 (20,000) | 75.3 ± 4 c |
| | C2 (39,000) | 80.3 ± 4 b |
| | C3 (49,000) | 94.7 ± 6.1 a |
| Suelo (S) | C1 (20,000) | 0.0 |
| | C2 (39,000) | (Presencia de biofilm bacteriano) |
| | C3 (49,000) | |
| Testigo (T) | Agua destilada Estéril | 0.0 |

^x Tratamientos con al menos una letra en común son estadísticamente iguales (Tukey, $p = 0.05$). / ^{*} Treatments with at least one common letter are statistically equal (Tukey, $p = 0.05$).

treatment leaflets (Figure 2S). Despite the bacteria(s) were not identified, the survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* has been reported on bean-fields soil surface, with dispersal capacity due to impact or particle splashing (Torres *et al.*, 2019; Gent *et al.*, 2005). These results confirm that abiotic factors' effect on infection, contagion, and dispersal of *Alternaria* and other organisms (Kumar *et al.*, 2021; Lione *et al.*, 2020). Likewise, it suggests that effectiveness of *A. alternata* inoculum load on beans may depend on secondary factors for infective success,

$\sigma^2-s = 514.1$). Estos materiales tuvieron alta intensidad de daño (clase 4, 41.5%) en fructificación, correspondiendo con un incremento y coalescencia significativa de focos (Figura 4C-B2, B4, 4D-B2). *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro* y *Segregante Oti* presentaron dependencia espacial en pequeños focos aleatorios 2-3 plantas ($n = 103$, $\sigma^2-p = 28.8$, $\sigma^2-s = 87.1$), con reducción de severidad en fructificación asociada a senescencia y pérdida de tejido foliar (Figura 4C, 4D-B12). *Pinto Texcoco*, *Flor de Mayo* o *Garrapato* representaron materiales con patrón de dispersión en *agregados discontinuos* de 4-5 plantas ($n = 58.3$, $\sigma^2-p > 72.9$, $\sigma^2-s = 131.2$) y severidad moderada (Figura 4C, 4D-B3). *Vaquita Negro* reportó dependencia *uniforme* de baja intensidad ($n = 102$, $\sigma^2-p \approx 0$, $\sigma^2-s = 172.8$), aunque asociada a vigor de planta muy bajo (0.1) y alta susceptibilidad a BCMV (58.1%), por lo que podría ser efecto de competencia más que tolerancia (Figura 4C, 4D-B11).

Los datos microclimáticos registrados durante el experimento mostraron humedad relativa (HR) *mínimas* entre 22 - 51% y HR-*máximas* >77%; temperatura (T) *mínimas* de 11.6 - 15.8 °C y T-*máxima* de 21.6 - 28.9 °C, y frecuencia discontinua de precipitaciones *post-floración* y fructificación. Considerando que estas condiciones son óptimas para crecimiento micelial y esporulación de *A. alternata* (Prasad y Ahir, 2013), los patrones de dispersión exhibidos podrían representar la aptitud parasítica real del hongo condicionada por el genotipo. En consecuencia, el potencial epidémico del hongo dependerá de fuertemente del factor genético y de otros componentes abióticos que contribuyan a la infección (Cuadro 4).

Efectos abióticos asociados a la infección de *A. alternata* en frijol. La simulación de daño por Viento (V) y Granizo (G) propició síntomas en 100% de los folíolos experimentales, no así para

thus could be considered an opportunistic fungus (Armitage *et al.*, 2020). Bean may have evolved efficient structural defense mechanisms during the long plant-pathogen coevolutionary process in America, area of bean domestication (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Even though a hail event is erratic, the tissue damage by wind in high density crops, such as in *P. vulgaris*, can be intermittent and determinant for disease (de Langre, 2008).

CONCLUSIONS

Applying classical cultural-morphology, genomic, and pathogenic criteria, *Alternaria alternata* was identified as the causal agent of leaf blight in 12 genotypes of bean (*P. vulgaris*). Accessions OL229866, OL229867, OL229868, OL229869, and OL229870 were registered in the GenBank. Similarly, through universal primers for Potyvirus and Begomovirus, the association of Potyvirus *Bean common mosaic virus* with all genotypes was only found. Accessions OL229871, OL229872, OL229873, OL229874, and OL229875 were also registered. In flowering and fruit phenological stages, *Negro Perla* genotype was the most tolerant with 6.7 - 9.6% and 6.2 - 10% severity associated with BCMV and *A. alternata*, respectively. *Canario* was the most susceptible genotype with maximum values of 48.7% and 42.7%. Vigor integration with severity caused by both organisms (IDI) confirmed *Negro Perla* as the most tolerant variety. Geospatial studies demonstrated differential damage intensity among genotypes and higher BCMV epidemic capacity. *A. alternata* could be an opportunistic pathogen. A canopy coverage *Vigor Index* (IV) assisted with single exposure aerial-drone imagery; *Integrated Damage Index* (IDI) with vigor values and multi-pathogen severity levels; logarithmic-diagrammatic

Suelo (*S*) y Testigo absoluto (Cuadro 4). Se reprodujeron lesiones necróticas causadas por la inoculación de la cepa FPTA2h de *A. alternata* (Figura 2B). La severidad foliar de *A. alternata* fue directamente proporcional a la concentración de conidios de *A. alternata* aplicada por cada factor de simulación. En general, el efecto de *G* indujo mayor rango de severidad con 75.3 - 94.7% con respecto a *V* que osciló entre 66 - 95.7% (Tukey, $p = 0.05$). Los tratamientos *V* y *G* con una concentración de 49000 conidios mL⁻¹ (C3) tuvieron 95.3% y 94.7% de severidad, respectivamente (Cuadro 4; Figura 2B). Las concentraciones 39000 (C2) y 20000 mL⁻¹ (C1) en *G*, indujeron severidad de 80.3% y 75.3%, respectivamente, los cuales fueron iguales estadísticamente entre sí (Tukey, $p = 0.05$). En los tratamientos *V*-C1 y *V*-C2 se tuvo severidad similar de 66% y 64.3% (Cuadro 4; Figura 2B).

En foliolos de los tratamientos *S*-C_i se encontró un biofilm de colonias putativamente asociadas a bacterias fitopatógenas presentes en suelo (Figura 2S). Aunque no se identificó a la bacteria(s), se reporta sobrevivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* y *X. axonopodis* pv. *phaseoli* en superficie del suelo cultivado con frijol, con capacidad de dispersión por impacto o salpique de partículas (Torres *et al.*, 2019; Gent *et al.*, 2005). Estos resultados ratifican el efecto de factores abióticos en procesos de infección, contagio y dispersión de *Alternaria* y otros organismos (Kumar *et al.*, 2021; Lione *et al.*, 2020). Asimismo, sugiere que la efectividad de la carga de inóculo de *A. alternata* en frijol puede depender de factores secundarios para el éxito infeccioso, por lo que podría considerarse hongo oportunista (Armitage *et al.*, 2020). El frijol pudo haber desarrollado eficientes mecanismos de defensa estructurales durante el largo proceso coevolutivo planta-patógenos en América, su centro de origen (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Si bien un evento de granizo es errático, el daño de tejido por viento en cultivos de alta densidad de

scale at leaf and row-canopy levels; and the App-Monitor® v1.1 Android®, available in PlayStore®, are proposed as novel methodologies to optimize comprehensive breeding programs incorporating phytosanitary factors to complement the phenotypic approach to assess yield components.

ACKNOWLEDGMENTS

To CONACYT for scholarships granted to graduate students involved in this research as part of the FIT612 Epidemiology class at the Postgraduate College (CP). To the CP-Seed Production Program for funding. To CP-LANREF team, especially to Verónica Martínez Bustamante and Juan José Coria Contreras for logistical support. To CP authorities and students to trust and conduct this project during the most critical period of the COVID-19 pandemic, overcoming responsibly, the confinement and social distancing restrictions.

LITERATURE CITED

- Agarwal G, Kavalappara SR, Gautam S, Silva Ad, Simmons A, Srinivasan R and Dutta B. 2021. Field screen and genotyping of *Phaseolus vulgaris* against two Begomoviruses in Georgia, USA. *Insects* 12:49. <https://doi.org/10.3390/insects12010049>
- Armitage AD, Cockerton HM, Sreenivasaprasad S, Woodhall J, Lane CR, Harrison RJ and Clarkson JP. 2020. Genomics evolutionary history and diagnostics of the *Alternaria alternata* species group including apple and asian pear pathotypes. *Frontiers Microbiology* 10:3124. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03124>
- Barnet HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. American Phytopathological Society. USA. 240p.
- Berrouet-Vanegas KM, Gutiérrez-Sánchez A y Marín-Montoya A. 2014. Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis. *Acta Biológica Colombiana* 19: 143-153. <https://doi.org/10.15446/abc.v19n2.39154>
- Bird GW and Warner F. 2018. Nematodes and Nematologists of Michigan. In: Subbotin, S., Chitambar, J. (eds) *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America*. Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99588-5_3
- Bitocchi E, Rau D, Bellucci E, Rodriguez M, Murgia ML, Gioia T, Santo D, Nanni L, Attene G and Papa R. 2017. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a model for understanding crop

siembra, como en *P. vulgaris*, puede ser continuado y determinante para la enfermedad (de Langre, 2008).

CONCLUSIONES

Aplicando criterios morfológicos, genómicos y patogénicos se identificó *Alternaria alternata* como el agente causal de un tizón foliar en 12 genotipos de frijol (*P. vulgaris*). Las accesiones OL229866, OL229867, OL229868, OL229869 y OL229870 se registraron en GenBank. Análogamente, mediante iniciadores universales para Potyvirus y Begomovirus, se demostró únicamente la asociación del potyvirus *Bean common mosaic virus* con todos los genotipos. Se registraron las accesiones OL229871, OL229872, OL229873, OL229874 y OL229875. En etapas fenológicas de floración y fructificación, se determinó que el genotipo *Negro Perla* fue el más tolerante con 6.7 - 9.6% y 6.2 - 10% de severidad asociada a BCMV y *A. alternata*, respectivamente. *Canario* fue el genotipo más susceptible con valores máximos de 48.7% y 42.7%. La integración del vigor con la severidad causada por ambos organismos (IDI) confirmó a *Negro Perla* como la variedad más tolerante. Estudios geoespaciales demostraron intensidad de daño diferencial entre genotipos y la mayor aptitud epidémica del BCMV. *A. alternata* podría ser un patógeno oportunista. Se propone el *Índice de Vigor* de cobertura de dosel (IV) asistido con imágenes áreas-drone de exposición simple; *Índice de Daño Integrado* (IDI) con valores de vigor y niveles de severidad multipatógeno; escalas logarítmicas diagramáticas a nivel de hoja y cobertura foliar; y la App-Monitor® v1.1 Android®, disponible en PlayStore®, como no-veles propuestas para optimizar programas de mejoramiento integrales que incorporen factores fitosanitarios que complementen el enfoque fenotípico de componentes de rendimiento.

- evolution. *Frontiers in Plant Science* 8:722. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00722>
- De Freitas-Vanzo AT, Da Silva CC, De Novaes TG, Walz DM, Guimarães FCM, Kuwahara MK, Molina RO and Leite RPJ. 2021. Evaluation of disease severity caused by *Bean golden mosaic virus* in different bean cultivars. *Canadian Journal of Plant Pathology* 43(1): 172-178. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1771618>
- de Langre E. 2008. Effects of wind on plants. *Annual Review of Fluid Mechanics* 40:141-168. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.40.111406.102135>
- De Ron AM and Santalla M. 2013. *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition). Academic Press. Pages 290-292. ISBN 9780080961569. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01145-1>.
- Delgado SA y Gama LS. 2015. Diversidad y distribución de los frijoles silvestres en México. *Revista Digital Universitaria [en línea]* 16(2). <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art10/index.html>. ISSN: 1607-6079.
- Estrada-Gómez JA, Estrada-Trejo V, Hernández-Livera A, Molina-Moreno JC y Campos-Escudero A. 2004. Oti, una nueva variedad de frijol para el valle de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 115-116. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/27-1/15a.pdf>
- Flores-Estévez N, Acosta-Gallegos JA and Silva-Rosales L. 2003. *Bean common mosaic virus* and *Bean common necrosis virus* in Mexico. *Plant Disease* 87: 21-25. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.1.21>
- Gent DH, Lang JM and Schwartz HF. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease* 89: 558-564. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0558>
- Gilbertson RL, Batuman O, Webster CG and Adkins S. 2015. Role of the supervectors insect *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis*, in the emergence and global spread of plant viruses. *Annual Review of Virology* 2: 67-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085410>
- González-Cruces JA, Ramírez-Razo K, Díaz-Arias KV, Buendía-Ayala BL, Cristóbal-Martínez AL, Consuelo-Isidoro A, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras JJ and Mora-Aguilera G. 2020. Diagrammatic logarithmic scales for bean-leaf spot severity by *Alternaria* sp. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(Suplemento): 71-72. https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/suplemento382020/Resumenes_Posters.pdf
- Green M and Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Four Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1936 p.
- Kumar S, Kansal S, Bhardwaj C, Kaushal S, Dangi R, Thakur A and Karn M. 2021. Effect of abiotic factors on progression of *Alternaria* blight of brinjal. *The Pharma Innovation Journal* 10(6): 95-100. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2021/vol10issue6/PartB/10-6-189-452.pdf>
- Lepe-Soltero D, Sánchez-García B, Jiménez-Hernández Y, Salinas-Perez, R, García-Neria M, González de León D, Becerra-Leor E, Acosta-Gallegos J, Silva Rosales L, Silva Rosales L and Silva Rosales L. 2012. Presence of BCMV and BCMNV in five dry bean-producing States in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15(2): 313-321.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por las becas de postgrado otorgadas a los estudiantes que participaron en esta investigación en el contexto del curso Epidemiología FIT612 en el Colegio de Postgraduados (CP). A CP-Producción de Semillas por el financiamiento de la investigación. Al equipo CP-LANREF, en particular a Verónica Martínez Bustamante y Juan José Coria Contreras por apoyo logístico. Al CP y estudiantes por su confianza en la ejecución de este proyecto durante la etapa más álgida de la pandemia COVID-19 superando, responsablemente, las restricciones de confinamiento y distanciamiento social.

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

<https://www.revista.criba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1243/747>

- Lione G, Giordano L, Turina M and Gonthier P. Hail-induced Infections of the chestnut blight pathogen *Cryphonectria parasitica* depend on wound size and may lead to severe diebacks. *Phytopathology* 110:1280-1293. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0006-R>
- Mangani BC, Were HK, Ndong'a M and Mukoye B. 2020. Incidence and severity of bean common mosaic disease and resistance of popular bean cultivars to the disease in western Kenya. *Journal of Phytopathology* 168: 501– 515. <https://doi.org/10.1111/jph.12928>
- Mena CJ y Velázquez RV. 2010. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades de Frijol en Zacatecas. Folleto Técnico No. 24. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 83 p. <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/PlagasFrijol.pdf>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado O, Coria-Contreras J, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante V, López-Buenfil A, González-Gómez R y Javier-López M. 2021. Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease. *Mexican Journal Phytopathology* 39(3): 452-492. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-6>
- Moraes MHD and Menten JOM. 2006. Transmission of *Alternaria* spp. by common bean seeds and its effects on physiological quality. *Summa Phytopathologica* 32(4): 381-383. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000400012>

- Murere LW, Were HK, Mukoye B and Kollenberg M. 2018. Distribution of BCMV and response of common bean varieties to Bean common mosaic virus in western Kenya. *International Journal of Academic and Applied Research* 2(9):1-7. ISSN: 2000-005X. <https://philarchive.org/archive/MURDOB>
- Mwaiopopo B, Nchimbi-Msolla S, Njau PJR, Mark D and Mbanziwira DR. 2018. Comprehensive surveys of *Bean common mosaic virus* and *Bean common necrosis virus* and molecular evidence for occurrence of other *Phaseolus vulgaris* viruses in Tanzania. *Plant Disease* 102: 2361-2370. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0198-RE>
- O'Donnell J and Dickinson CH. 1980. Pathogenicity of *Alternaria* and *Cladosporium* isolates on *Phaseolus*. *Transactions of the British Mycological Society* 74(2): 335-342. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80164-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80164-1)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, División de Estadística (FAOSTAT). 2022. <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Pedroza-Sandoval A, Trejo-Calzada R, Chávez-Rivero JA y Samaniego-Gaxiola JA. 2013. Tolerancia al estrés hídrico y fitosanitario mediante indicadores agronómicos y fisiológicos en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 91-104. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509001>
- Prasad LB and Ahir RR. 2013. Role of temperature and relative humidity on mycelial growth of *Alternaria alternata* infecting brinjal. *Trends in Biosciences* 6(3): 307-308. <https://www.researchgate.net/publication/351481659>
- Rendón-Anaya M, Montero-Vargas JM, Saburido-Álvarez S, Vlasova A, Capella-Gutiérrez S, Ordaz-Ortiz JJ, Aguilar OM, Vianello-Brondani RP, Santalla M, Delaye L, Gabaldón T, Gepts P, Winkler R, Guigó R, Delgado-Salinas A and Herrera-Estrella A. 2017. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biology* 18(1): 60. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1190-6>
- Rojas MR, Macedo MA, Maliano MR, Soto-Aguilar M, Souza JO, Bridson RW, Kenyon L, Rivera-Bustamante RF, Zerbini FM, Adkins S, Legg JP, Kvarneden A, Wintermantel WM, Sudarshana MR, Peterschmitt M, Lapidot M, Martin DP, Moriones E, Inoue-Nagata AK and Gilbertson RL. 2018. World management of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 56(1): 637-677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100327>
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russel DR and Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0340>
- SADER y SNICS. 2022. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Catálogo nacional de variedades vegetales en línea. <https://datastudio.google.com/u/0/reporting/5b7206ba-e190-48fe-9696-73523bfccf58/page/itBWB>.
- SIAP. 2020. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap>.
- Simmons EG. 2007. *Alternaria*, An Identification Manual, Fully Illustrated and with Catalograisonné 1796-2007. CBS Fungal Biodiversity Centre. 775 p.
- Subramanya KS. 2013. *Virus Transmission, Seed-Borne. Plant Virus Diseases*. Springer. India. 343p. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6_4)
- Thomma, BPHJ. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225-236. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- Torres JP, Maringoni AC and Silva TAF. 2009. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. *Journal of Plant Pathology* 91: 195-198. <http://doi.org/10.4454/jpp.v91i1.642>
- Watanabe H, Taguchi Y, Hyakumachi M and Kageyama K. 2007. *Pythium* and *Phytophthora* species associated with root and stem rots of kalanchoe. *Journal Genetic Plant Pathology* 73: 81-88. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0338-0>
- White TJ, Bruns TD, Lee SB and Taylor JW. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Pp. 315-322. *In* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. California, USA. 460 p. [https://www.researchgate.net/publication/262687766\\_Amplification\\_and\\_Direct\\_Sequencing\\_of\\_Fungal\\_Ribosomal\\_RNA\\_Genes\\_for\\_Phylogenetics](https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics)
- Worrall EA, Wamonje FO, Mukeshimana G, Harvey JJW, Carr JP and Mitter N. 2015. *Bean common mosaic virus* and *Bean common mosaic necrosis virus*: Relationships, Biology and Prospects for Control Pp. 1-46. *In*: *Advances in Virus Research* 93: 319. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.04.002>
- Zheng L, Wayper PJ, Gibbs AJ, Fourment M, Rodoni BC and Gibbs MJ. 2008. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. *PLoS ONE* 3(2): 1586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001586>



# Resistance evaluation of oat genotypes to stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*)

## Evaluación de la resistencia de genotipos de avena a roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*)

**Julio Huerta-Espino**, <sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco Km 13.5 Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, CP 56250, México; **Erika Evelin Ramírez-Ramírez**, **Santos Gerardo Leyva-Mir**, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, Km 38.5. Chapingo, Estado de México. CP 56230; **Héctor Eduardo Villaseñor-Mir**, **René Hortelano Santa-Rosa**, **Eliel Martínez-Cruz**, **María Florencia Rodríguez-García**\*.  
\*Corresponding autor: rodriguez.maria@inifap.gob.mx

Received: February 08, 2022.

Accepted: April 01, 2022.

Huerta-Espino J, Ramírez-Ramírez EE, Leyva-Mir SG, Villaseñor-Mir HE, Santa-Rosa RH, Martínez-Cruz E and Rodríguez-García MF. 2022. Resistance evaluation of oat genotypes to stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*). Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 221-229.  
DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-1>

Primera publicación DOI: 14 de Abril, 2022.  
First DOI publication: April 14, 2022.

**Abstract.** The resistance in seedling and adult plant of 13 varieties and 37 lines of oats against stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* was evaluated. TNQ and TFQ races and isolates AMEX18.21.1.1 and AMEX18.18.1.1 for seedling evaluation; and AMEX18.18.1.1 isolate in adult plants were used. The Diamante, Menonita, Karma and Turquesa varieties were resistant in seedling to the TFQ race, but susceptible to TNQ and the isolates AMEX18.21.1.1 and AMEX18.18.1.1, the other varieties were susceptible to the two races and

**Resumen.** Se estudió la resistencia en plántula y planta adulta de 13 variedades y 37 líneas de avena contra la roya del tallo causada por *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. Se utilizaron las razas TNQ y TFQ y los aislamientos AMEX18.21.1.1 y AMEX18.18.1.1 para la evaluación en plántula; y el aislamiento AMEX18.18.1.1 en planta adulta. Las variedades Diamante, Menonita, Karma y Turquesa fueron resistentes en plántula a la raza TFQ, pero susceptibles a TNQ y a los aislamientos AMEX18.21.1.1 y AMEX18.18.1.1, las otras variedades fueron susceptibles a las dos razas y aislamientos. Todas las variedades fueron susceptibles al aislamiento AMEX18.18.1.1, en plántula, pero en planta adulta éstas se clasificaron en susceptibles, intermedias y solo Teporaca fue resistente. Las 37 líneas se clasificaron en 17 grupos por la severidad final y por líneas hermanas. Los genotipos 25, 28, 34, 39 y 48 fueron resistentes en plántula a AMEX18.18.1.1, y el resto fueron susceptibles. En campo todas las líneas fueron resistentes y solo el genotipo 19 del grupo 14, alcanzó un 20% de infección.

isolates. All varieties were susceptible to isolate AMEX18.18.1.1, in seedling, but in adult plants these were classified as susceptible, intermediate and only Teporaca was resistant. The 37 lines were classified into 17 groups by final severity and sister lines. Genotypes 25, 28, 34, 39 and 48 were seedling resistant to AMEX18.18.1.1, and the rest were susceptible. In the field all the lines were resistant and only genotype 19 of group 14, reached a 20% infection. From its response in seedlings and in adult plants of the advanced lines, it is inferred that resistance is conditioned by adult plant genes.

**Key words:** virulence, races, isolates.

The oat (*Avena sativa*) crop has, in the past three decades, increased in importance in rainfed cultivations, particularly when the traditional crops such as maize, wheat, barley and beans are damaged or it is no longer convenient to plant them (Villaseñor *et al.*, 2021). In the year 2020, 94% of the surface planted with oat was used for the production of animal feed in its different forms, where 75% of the cultivations were carried out under rainfed conditions (SIAP, 2022). Oat is a cereal that adapts well to high, cold and rainy areas, but it also adapts to semi-arid environments and it is a good alternative when other crops do not prosper (Villaseñor *et al.*, 2021). This crop, like other cereals, is exposed to diseases caused by fungi, out of which rusts are the most destructive. Stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* is one of the most devastating for the crop and it has a broad weather range. In Mexico, it is the disease that most affects oat production, since it can reduce yields by up to 70%, as indicated by Leyva *et al.* (2004). An important reason for this is the large diversity of races of the populations of the pathogens and their continuous evolution, as mentioned by Mariscal

Por su respuesta en plántula y en planta adulta de las líneas avanzadas, se infiere que la resistencia está condicionada por genes de planta adulta.

**Palabras clave:** virulencia, razas, aislamientos.

El cultivo de avena (*Avena sativa*) en las últimas tres décadas ha tomado importancia en las siembras de temporal, sobre todo cuando los cultivos tradicionales como maíz, trigo, cebada y frijol se siniestran o ya no era conveniente sembrarlos (Villaseñor *et al.*, 2021). Durante el 2020, de la superficie sembrada de avena, el 94% se destinó para la producción de forraje en sus diferentes formas en donde el 75% de las siembras se realizaron bajo condiciones de temporal (SIAP, 2022). La avena es un cereal con buena adaptación a zonas altas, frías y lluviosas, pero también se adapta en ambientes semiáridos y es buena alternativa cuando otros cultivos no prosperan (Villaseñor *et al.*, 2021). Este cultivo al igual que otros cereales, está expuesto a enfermedades causadas por hongos, de los cuales las royas son las más destructivas. La roya del tallo causada por *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* es una de las más devastadora del cultivo y tiene un rango de adaptación climática muy amplio. En México es la enfermedad que más afecta la producción de avena ya que puede disminuir el rendimiento hasta en un 70% como lo indican Leyva *et al.* (2004). Una razón importante, por lo que sucede esto, es la gran diversidad de razas existentes en las poblaciones del patógeno y su continua evolución como lo mencionan Mariscal *et al.* (2011), quienes reportan la presencia de 24 razas fisiológicas de roya del tallo en zonas productoras de Oaxaca, Puebla, Hidalgo, Aguascalientes, Durango y Zacatecas. Por otro lado, la existencia de hospedantes alternos como la avena silvestre (*A. fatua*) que es susceptible a esta enfermedad, perpetua la presencia del inóculo durante

*et al.* (2011), who report the presence of 24 physiological stem rust races in production areas in Oaxaca, Puebla, Hidalgo, Aguascalientes, Durango and Zacatecas. On the other hand, the existence of secondary hosts, such as wild oat (*A. fatua*), which is susceptible to this disease, perpetuates the presence of the inoculum throughout the year in all the production areas, including those not reported as oat-producing areas.

The most effective control for stem rust in oat is achieved with the use of resistant varieties (Villaseñor *et al.*, 2021). The fungicides applied on the foliage can be used to efficiently protect the crops (Leyva *et al.*, 2018), although they increase production costs, therefore genetic breeding via the generation of resistant varieties is an effective method to manage the disease. Given the importance of stem rust in oat, the aim of this investigation was to evaluate the resistance of oat lines and varieties to stem rust in seedlings and adult plants.

The seedling tests were carried out in the National Laboratory for Rust and other Cereal Diseases (Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades de Cereales - LANAREC), of the National Forestry, Agriculture and Husbandry Institute (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - INIFAP) Valle de México Experimental Field (CEVAMEX) located at 19° 29' LN and 99° 53' LW at an altitude of 2,250 masl (García, 1981). Eight sets of the 18th National Oat Trial (Ensayo Nacional de Avena - 18th EUAVENA) were planted in order to inoculate each set with two races and two stem rust isolates in a completely randomized design with two repetitions. The 50 genotypes of the 18th EUAVENA, out of which 13 are control varieties and 37 are advanced lines, were planted in 20 x 30 x 6 cm plastic trays, which were added a mixture of sterile soil and peat moss in a 60:40 ratio; small orifices were then marked and eight to nine

todo el año en todas las regiones productoras e inclusive en aquellas áreas no reportadas como productoras de avena.

El control más efectivo de la roya del tallo de la avena se logra mediante el uso de variedades resistentes (Villaseñor *et al.*, 2021). Los fungicidas aplicados al follaje pueden usarse para proteger eficazmente los cultivos (Leyva *et al.*, 2018) pero incrementan el costo de producción, por lo que el mejoramiento genético a través de la generación de variedades resistentes es un método efectivo en el manejo de la enfermedad. Dada la importancia de la roya del tallo en avena, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la resistencia de líneas y variedades de avena a la roya del tallo en plántula y planta adulta.

Las pruebas de plántula se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades de Cereales (LANAREC) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) localizado a 19° 29' LN y 99° 53' LO a una altitud de 2,250 msnm (García, 1981). Se sembraron ocho juegos del 18avo Ensayo Nacional de Avena (18vo EUA-VENA), con el propósito de inocular cada juego con dos razas y dos aislamientos de roya del tallo en un diseño completamente al azar con dos repeticiones. Los 50 genotipos del 18avo EUAVENA, de los cuales 13 son variedades testigo y 37 líneas avanzadas, se sembraron en charolas de plástico de 20 x 30 x 6 cm a las que se les agregó una mezcla de tierra estéril y peat moss en una proporción 60:40, se marcaron pequeños orificios y se colocaron de ocho a nueve semillas por genotipo. A los 12 días después de la siembra, los 50 genotipos se inocularon con la raza TNQ y TFQ y los aislamientos AMEX18.21.1.1 (proveniente de Moxolahuac, Puebla, México, con virulencia para la variedad Turquesa en el año 2018) y AMEX18.18.1.1

seeds were added per genotype. Twelve days after planting, the 50 genotypes were inoculated with the races TNQ and TFQ and isolates AMEX18.21.1.1 (from Moxolahuac, Puebla, Mexico, with a virulence for the Turquesa variety in the year 2018) and AMEX18.18.1.1 (gathered in 2018 in Santa Lucia, Texcoco, Estado de México of the Chihuahua variety, and considered to have been dominant in the field). The inoculation was carried out with a suspension of urediniospores at a concentration of  $1 \times 10^6$  urediniospores/mL, which were suspended in mineral oil (Sotrol® 170) and sprayed with a nozzle connected to a compressor. The inoculated plants were moved to a bioclimatic chamber at 25 °C for 24 h and dew at 100%. Later, they were moved to the greenhouse, where the temperatures were 24 °C in the day and 15-20 °C in the night. The infection types (IT) were recorded 14 days after inoculation. To determine the TI, the scale proposed by Roelfs *et al.* (1992) for wheat stem rust was used, in which the genotypes with values of 3 and 4 were classified as susceptible whereas 0, ;, 1, 2 and X as resistant.

For the test in adult plants, the 50 genotypes of the 18th EUAVENA were planted in the Santa Lucia Experimental Field of the CEVAMEX in the summer of 2018 (July 9) under rainfed conditions in a completely randomized block experimental design with two repetitions. Planting was carried out by hand, at a density of 120 kg ha<sup>-1</sup>. The occurrence of the pathogen was natural, and to ensure the presence of the *P. graminis* f. sp. *avenae* inoculant, the edge was planted with the Chihuahua variety, which helped disperse the inoculant. The severity of the disease was registered three times with 8-day intervals, using Cobb's modified scale (Peterson *et al.*, 1948) which ranges from 0 to 100% of the infected stem, including the peduncle.

**Response in seedling.** The varieties Diamante, Menonita, Karma and Turquesa were resistant to

(colectado en 2018 en Santa Lucia, Texcoco, Estado de México de la variedad Chihuahua y se considera fue el dominante en campo). La inoculación se realizó con una suspensión de urediniosporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  urediniosporas/mL, éstas fueron suspendidas en aceite mineral (Sotrol® 170) y asperjadas con un atomizador conectado a un compresor. Las plantas inoculadas se pasaron a una cámara bioclimática con temperatura de 25 °C por 24 h y rocío al 100%. Posteriormente, se trasladaron a invernadero con temperaturas de 24 °C de día y de 15-20 °C noche. Los tipos de infección (TI) se registraron a los 14 días después de la inoculación. Para determinar el TI se usó la escala propuesta por Roelfs *et al.* (1992) para roya del tallo de trigo, donde los genotipos con valores 3 y 4 fueron clasificados como susceptibles y 0-, ;-, 1, 2 y X como resistentes.

Para la prueba en planta adulta, los 50 genotipos del 18avo EUAVENA fueron sembrados en el Campo Experimental de Santa Lucia del CEVAMEX durante el verano del 2018 (9 de julio) bajo condiciones de temporal en un diseño experimental de bloques completamente al azar con dos repeticiones. La siembra se realizó de manera manual a una densidad de 120 kg ha<sup>-1</sup>. La ocurrencia del patógeno fue de forma natural, y para asegurar la presencia de inóculo de *P. graminis* f. sp. *avenae*, se sembró un bordo de la variedad Chihuahua que sirvió como surco dispersor del inóculo. La severidad de la enfermedad se registró en tres ocasiones con intervalos de 8 días usando la escala modificada de Cobb (Peterson *et al.*, 1948) que va del 0 al 100% del tallo infectado incluyendo el pedúnculo.

**Respuesta en plántula.** Las variedades Diamante, Menonita, Karma y Turquesa fueron resistentes a la raza TFQ; pero susceptibles a TNQ y a los aislamientos AMEX18.21.1.1 y AMEX18.18.1.1, las otras variedades presentaron susceptibilidad a los

the race TFQ, but susceptible to TNQ and to isolates AMEX18.21.1.1 and AMEX18.18.1.1, whereas the other varieties displayed susceptibility to the four isolates. Among the advanced lines, labelled with the numbers 19, 24, 26 and 49, the same behavior was observed. Other lines that were resistant to at least one of the isolates were differentiated and classified in up to six groups, based on the response to the inoculation with the four isolates (Table 1); the lines not included in the table were susceptible to the four isolations.

**Response of adult plant on the field.** The environmental conditions favored the natural presence of *P. graminis* f. sp. *avenae*, which allowed for the expression of resistance in the varieties and advanced lines of the 18th EUAVENA. The levels of infection caused by stem rust in the evaluated genotypes were very similar for both repetitions, although the average of the final severity is still reported. The response of the varieties to isolate AMEX18.18.1.1 was of susceptibility at seedling, but in adult plants, they were classified as susceptible, intermediate and only Teporaca was

cuatro aislamientos. Entre las líneas avanzadas, identificadas con los números 19, 24, 26 y 49 se observó el mismo comportamiento. Otras líneas que fueron resistentes por lo menos a uno de los aislamientos se diferenciaron y clasificaron hasta en seis grupos con base en la respuesta a la inoculación con los cuatro aislamientos (Cuadro 1), las líneas no incluidas en dicho cuadro fueron susceptibles a los cuatro aislamientos.

**Respuesta de planta adulta en campo.** Las condiciones ambientales favorecieron la presencia de manera natural de *P. graminis* f. sp. *avenae* lo que permitió la expresión de la resistencia en las variedades y líneas avanzadas del 18avo EUAVENA. Los niveles de infección causados por la roya del tallo en los genotipos evaluados, para ambas repeticiones, fueron muy similares; pero, aun así, se reporta el promedio de la severidad final. La respuesta de las variedades al aislamiento AMEX18.18.1.1 fue de susceptibilidad en plántula, pero en planta adulta estas se clasificaron en susceptibles, intermedias y solo Teporaca se consideró como resistente como se observa en la Figura 1. Las 37 líneas por

**Table 1. Advanced oat lines grouped according to their response to four *P. graminis* f. sp. *avenae* isolates.**  
**Cuadro 1. Líneas avanzadas de avena agrupadas de acuerdo con su respuesta a cuatro aislamientos de *P. graminis* f. sp. *avenae*.**

| Grupo <sup>z</sup> | No. genotipo | Pedigrí                               | Raza o aislamiento |       |               |               |
|--------------------|--------------|---------------------------------------|--------------------|-------|---------------|---------------|
|                    |              |                                       | (TNQ)              | (TFQ) | AMEX18.21.1.1 | AMEX18.18.1.1 |
| A                  | 25           | AI/P-V/11-5340-42C-0R-1C-0R-1C-0R     |                    |       |               |               |
|                    | 34           | AVEINIFAP-2012-102-1C-3R-6C-0R-3C-0R  | S                  | S     | S             | R             |
| B                  | 39           | AVEINIFAP-2012-102-13C-2R-2C-0R-5C-0R |                    |       |               |               |
|                    | 31           | AVEINIFAP-2012-101-15C-2R-1C-0R-6C-0R | S                  | R     | R             | S             |
| C                  | 42           | AVEINIFAP-2012-102-24C-3R-7C-0R-3C-0R |                    |       |               |               |
|                    | 35           | AVEINIFAP-2012-102-1C-3R-3C-0R-1C-0R  |                    |       |               |               |
| D                  | 36           | AVEINIFAP-2012-102-11C-3R-1C-0R-1C-0R | R                  | R     | S             | S             |
|                    | 38           | AVEINIFAP-2012-102-13C-2R-2C-0R-2C-0R |                    |       |               |               |
| E                  | 27           | AI-O-I/11-5324-0C-17C-0R-1C-0R-1C     | R                  | S     | S             | S             |
| F                  | 28           | AI-O-I/11-5324-0C-17C-0R-1C-0R-3C     | R                  | R     | S             | R             |
|                    | 48           | AVEINIFAP-2012-103-2C-1R-4C-0R-2C-0R  | S                  | R     | R             | R             |

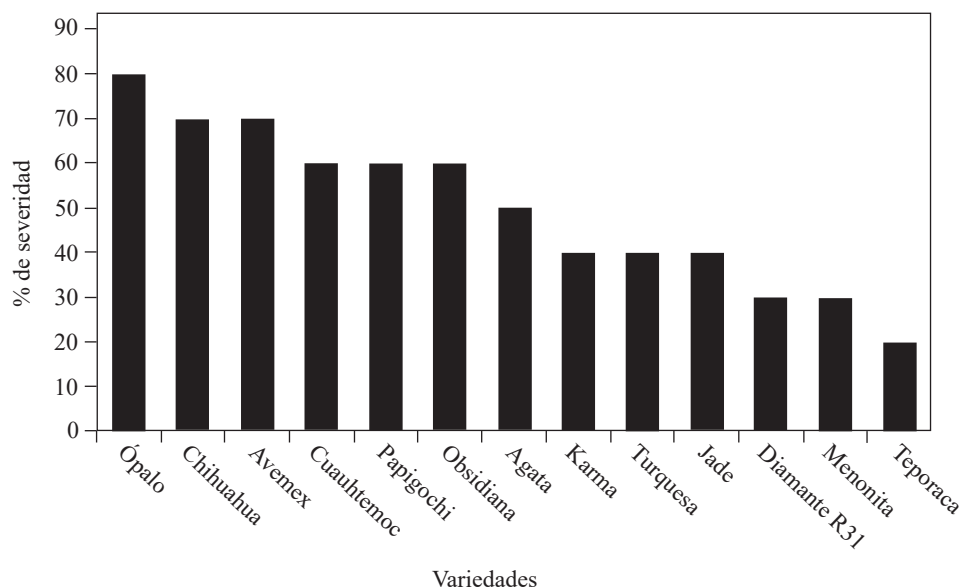
<sup>z</sup>Groups A-F include different genotypes with their respective number in the 18<sup>th</sup> EUAVENA. S=Susceptible; R=Resistant. / <sup>z</sup>Grupos A-F incluye diferentes genotipos con su número respectivo en el 18avo EUAVENA. S=Susceptible; R=Resistente.

considered as resistant, as shown in Figure 1. The 37 lines, due to their response in adult plants, were grouped by sister lines and by disease severity. Thus, 17 groups were identified, which are shown in Table 2. In reference to these same lines, only those identified as 25 (AI/P-V/11-5340-42C-0R-1C-0R-1C-0R), 28 (AI-O-I/11-5324-0C-17C-0R-1C-0R-3C) and three sister lines with numbers 34, 39 and 48 (AVEINIFAP-2012-102) were resistant as seedlings to isolate AMEX18.18.1.1, and the rest were susceptible to this same isolate. On the field, all lines were resistant with levels of infection no greater than 10%, and only line 19, from group 14, reached 20% of infection, as illustrated in Table 2.

The response shown in the seedling and adult plant of the lines allows us to infer that resistance is conditioned by adult plant genes. However, with the data obtained to date, it is still not possible to determine whether the resistance is conditioned by genes of race specific or if it is conditioned by the accumulation of multiple genes of additive effects.

su respuesta en planta adulta en el campo se agruparon por líneas hermanas y por la severidad final de la enfermedad. Así se identificaron 17 grupos, los cuales se presentan en el Cuadro 2. Con referencia a estas mismas líneas, solo las identificadas como 25 (AI/P-V/11-5340-42C-0R-1C-0R-1C-0R), 28 (AI-O-I/11-5324-0C-17C-0R-1C-0R-3C) y tres líneas hermanas con el número 34, 39 y 48 (AVEINIFAP-2012-102) fueron resistentes en plántula al aislamiento AMEX18.18.1.1, y las demás fueron susceptibles a este mismo aislamiento. En campo, todas las líneas fueron resistentes con niveles de infección no mayores al 10% y sólo la línea 19 del grupo 14, alcanzó un 20% de infección como se ilustra en el Cuadro 2.

La respuesta mostrada en plántula y en planta adulta de las líneas nos permite inferir que la resistencia está condicionada por genes de planta adulta. Sin embargo, con los datos obtenidos a la fecha, aún no es posible determinar si la resistencia es condicionada por genes de raza específica o si



**Figure 1. Percentages of infection observed on the field, caused by stem rust in 13 varieties of oat included in the 18<sup>th</sup> EUAVENA.**

**Figura 1. Porcentajes de infección observados en campo, causados por la roya del tallo en 13 variedades de avena incluidas en el 18avo EUAVENA.**

**Table 2. Grouping of the 37 oat lines included in the 18th EUAVENA by sister lines and the percentage of stem rust infection on the field.**  
**Cuadro 2. Agrupamiento de las 37 líneas de avena incluidas en el 18avo EUAVENA por líneas hermanas y el porcentaje de infección a la roya del tallo en el campo.**

| Grupo | Genotipos hermanos*  | Pedigrí                              | % Infección |
|-------|----------------------|--------------------------------------|-------------|
| 1     | 14                   | AI-OI/08-5042-0R-4C-0R-0C-0R-2C-0R   | 5           |
| 2     | 17,18                | AI-OI/09-5180-0R                     | 1           |
| 3     | 20                   | AI/P-V/09-5229-3C-0R-0C-0R-3C-0R     | 5           |
| 4     | 22,23,24,25,26       | AI/P-V/11-5340                       | 5           |
| 5     | 27,29                | AI-O-I/11-5324-0C-17C-0R-1C-0R       | 5           |
| 6     | 30,31,32             | AVEINIFAP-2012-101                   | 5           |
| 7     | 40,42,43,44,46       | AVEINIFAP-2012-102                   | 1           |
| 8     | 33,35,36,37,38,41,45 | AVEINIFAP-2012-102                   | 5           |
| 9     | 47,49                | AVEINIFAP-2012-103-2C-1R             | 5           |
| 10    | 15                   | AI-OI/08-5042                        | 10          |
| 11    | 16                   | AI-OI/09-5104-0R-5C-0R-0C-0R-9C-0R   | 10          |
| 12    | 21                   | AI/P-V/09-5229-6C-0R-0C-0R-3C-0R     | 10          |
| 13    | 50                   | AVEINIFAP-2012-103-2C-3R-2C-0R-5C-0R | 10          |
| 14    | 19                   | AI-OI/09-5102-0R-5C-0R-0C-0R-3C-0R   | 20          |
| 15    | 34,39                | AVEINIFAP-2012-102                   | 5           |
| 16    | 48                   | AVEINIFAP-2012-103-2C-1R-4C-0R-2C-0R | 5           |
| 17    | 28                   | AI-O-I/11-5324-0C-17C-0R-1C-0R-3C    | 5           |

\* From the same breed. / \* Provenientes de la misma craza.

The resistance to stem rust in oat varieties worldwide is not very common and there are no recent data or reports of any identification of sources of resistance. Furthermore, in some countries, all varieties are susceptible to existing races, such as in Australia (Park *et al.*, 2015). In Canada and the United States, it has been reported that there are no oat varieties that are resistant to the predominant races (Harder, 1994; Fetch *et al.*, 2002; Jin, 2021, personal communication).

The search for sources of resistance to stem rust in oat has led to conclude that variability is low or inexistent to races that currently prevail in Mexico and the different countries that produce this cereal. For example, a study in Canada suggested that the resistance to stem rust in *Avena* spp. is apparently not common, since out of 9978 accessions evaluated, only 47 lines (0.5%) displayed moderate to high levels of resistance to the race NA67 and

está condicionada por la acumulación de múltiples genes de efectos aditivos.

La resistencia a la roya del tallo en variedades de avena a nivel mundial no es muy común; y no hay datos recientes o reportes de identificación de fuentes de resistencia; inclusive en algunos países todas las variedades son susceptibles a las razas existentes como en Australia (Park *et al.*, 2015). En Canadá y Estados Unidos se reporta que no existen variedades de avena que sean resistentes a las razas predominantes (Harder, 1994; Fetch *et al.*, 2002; Jin, 2021, comunicación personal).

La búsqueda de fuentes de resistencia a la roya del tallo en avena ha permitido concluir que la variabilidad es baja o no existente a las razas que actualmente prevalecen en México y en los diferentes países productores de este cereal. Por ejemplo, un estudio en Canadá sugirió que la resistencia a la roya del tallo en *Avena* spp., aparentemente no es

only 71 (0.7%) displayed intermediate levels (Gold *et al.*, 2005). These results were very similar to those reported by Martens and Dyck (1989), who pointed out that the resistance to stem rust in oat was relatively rare. In previous studies that searched for resistance to stem rust in accessions of *Avena* spp., both wild and cultivated, from the Middle East, only 6 accessions out of the 1,538 evaluated (0.4%) displayed resistance to the race NA27 (Martens *et al.*, 1980). In Argentina, the only oat variety in use that was resistant to stem rust until 2004 was the genotype UFRGS-16 (Martinelli, 2004). Li *et al.* (2015) point out that they evaluated 35 oat genotypes for their resistance at seedlings to races TKR, TJM and TKM of stem rust, out of which only 13 were resistant to the three races.

This leads us to conclude that in the genus *Avena* spp. there is little variability for resistance to stem rust and thus the importance of this study, in which all the advanced lines that were a part of the 18th EUAVENA were resistant in adult plants to the same isolate to which they were susceptible as seedlings. The lines identified as resistant in adult plants were also resistant in other testing environments (no data shown). There are no reports of resistance in adult oat plants against *P. graminis* f. sp. *avenae*, making this the first of its kind. The challenge from here onwards is to use and maintain these levels of resistance in future oat varieties

Among the varieties evaluated, only Teporaca is considered resistant to stem rust in adult plants, whereas the other varieties range from susceptible to intermediate. The advanced lines included in the study were resistant, as adult plants on the field, to the same isolate they were susceptible as seedlings. These genotypes must be considered as sources of resistance in the crosses directed to the genetic breeding of oat in Mexico.

común; donde de 9978 accesiones evaluadas, solo 47 líneas (0.5%) mostraron niveles de moderados a altos de resistencia a la raza NA67 y solo 71 (0.7%) mostraron niveles intermedios (Gold *et al.*, 2005). Estos resultados fueron muy similares a lo reportado por Martens y Dyck (1989), quienes indicaron que la resistencia a la roya del tallo en la avena era relativamente rara. En estudios anteriores que buscaban resistencia a la roya del tallo en accesiones de *Avena* spp., silvestre y cultivada provenientes del Medio Oriente, solo 6 accesiones de 1,538 evaluadas (0.4%) mostraron resistencia a la raza NA27 (Martens *et al.*, 1980). En Argentina, la única variedad de avena en uso que fue resistente hasta el 2004 a la roya del tallo fue el genotipo UFRGS-16 (Martinelli, 2004). Li *et al.* (2015) indican que evaluaron 35 genotipos de avena por su resistencia en plántula a las razas TKR, TJM y TKM de roya del tallo, de los cuales solo 13 fueron resistentes a las tres razas.

De esto podemos concluir que dentro del género *Avena* spp., existe poca variabilidad para resistencia a la roya del tallo y de aquí la importancia del presente estudio donde todas las líneas avanzadas que formaron parte del 18avo EUAVENA fueron resistentes en planta adulta al mismo aislamiento al que en plántula la mayoría fueron susceptibles. Las líneas identificadas como resistentes en planta adulta también fueron resistentes en otros ambientes de prueba (no se muestran datos). No existen reportes de resistencia de planta adulta en avena contra *P. graminis* f. sp. *avenae* siendo este el primero en su tipo. El reto a futuro consiste en utilizar y mantener estos niveles de resistencia en las futuras variedades de avena.

Entre las variedades evaluadas, solo Teporaca se considera resistente a la roya del tallo en planta adulta, las otras variedades van de susceptibles a



## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by the INIFAP-CEVAMEX, within fiscal project No. 13505834821 “Generación de tecnología para incrementar la productividad del cultivo de avena de temporal en México” (Generation of technology to increase the productivity of the rainfed oat crop in Mexico).

## LITERATURE CITED

- Fetch TG, Gold J and Nevo E. 2002. Evaluation of wild oat germplasm for stem rust resistance. *In*: Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Congress on Plant Pathology. 2:195.
- García ME 1981. Modificaciones del sistema de clasificación climática de Köpen. Adaptada a condiciones de la República Mexicana. 3<sup>ra</sup> Edición. México, D.F. 149 p.
- Gold SJ, Mitchell FJ and Fetch TGJ. 2005. Evaluation of *Avena* spp. accessions for resistance to oat stem rust. *Plant Disease* 89(5):521-525. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0521>
- Harder DE. 1994. Identification of new races of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Plant Disease* 78(4):367-368. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0367>
- Li T, Cao Y, Wu X, Chen S, Wang H, Li K and Shen L. 2015. First report on race and virulence characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* and resistance of oat cultivars in China. *European Journal of Plant Pathology* 142(1):85-91. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0591-6>
- Leyva MSG, Espitia RE, Villaseñor MHE y Huerta EJ. 2004. Pérdidas ocasionadas por *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* Ericks. y Henn., causante de la roya del tallo en seis cultivares de avena (*Avena sativa* L.) en Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(2):166-171. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222202.pdf>
- Leyva MSG, Villaseñor MHE, Camacho TM, Ávila QGD, García LE y Tovar PJM. 2018. Respuesta de genotipos de avena a la infección por *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(2):317-328. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1074>
- Mariscal ALA, Huerta EJ, Villaseñor MHE, Leyva MSG, Sandoval IJS y Benítez RI. 2011. Selección de genotipos de avena para la identificación de razas de roya del tallo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(4):593-600. <https://doi.org/10.29312/remexca.v2i4.1646>
- Martens JW and Dyck PL. 1989. Genetics of resistance to rust in cereals from a Canadian perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11(1):78-85. <https://doi.org/10.1080/07060668909501152>
- Martens JW, McKenzie RIH and Harder DE. 1980. Resistance to *Puccinia graminis avenae* and *P. coronata avenae* in the wild and cultivated *Avena* populations of Iran, Iraq and Turkey. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 22(4):641-649. <https://doi.org/10.1139/g80-070>
- intermedias. Las líneas avanzadas incluidas en el estudio fueron resistentes en planta adulta en el campo al mismo aislamiento al que en plántula fueron susceptibles. Estos genotipos deben considerarse como fuentes de resistencia en los cruzamientos dirigidos para el mejoramiento genético del cultivo de avena en México.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el INIFAP-CEVAMEX, dentro del proyecto fiscal No. 13505834821 “Generación de tecnología para incrementar la productividad del cultivo de avena de temporal en México”.

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

- Martinelli JA. 2004. Oat diseases and their control *In*: Fodder oats: a world overview. Suttie JM and Reynolds SG (Edited). FAO Plant Production and Protection Series No. 33. 197-214pp. <https://www.fao.org/3/y5765e/y5765e0g.htm#bm16>
- Park R, Roake J and Kande K. 2015. Rust in oat: new challenges and international perspectives. *GroundCover™ Issue: 116*. <https://grdc.com.au/resources-and-publications/groundcover/ground-cover-issue-116-may+june-2015/rust-in-oat-new-changes-and-international-perspectives>
- Peterson R, Campbell A and Hannah A. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals *Canadian Journal of Research* 26c:496-500. <https://doi.org/10.1139/cjr48c-033>
- Roelfs AP, Singh RP and Saari EE. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México, D. F. CIMMYT. 81p. <https://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/1154>
- Sistema de Información Agrícola y Pecuaria (SIAP). 2022. Resumen nacional de avances agrícolas por estado. Producción anual. Cierre de la producción agrícola por cultivo. www.siap.gob.mx
- Villaseñor MHE, Huerta EJ, Rodríguez GMF, Hortelano SRR, Espitia RE y Martínez CE. 2021. Mejoramiento genético de avena en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Publicación especial* 25: 21-25. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i25.2808>

Potential biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp. TSO2 against *Bipolaris sorokiniana*, spot blotch in wheat

Mecanismos potenciales de biocontrol de *Bacillus* sp. TSO2 contra *Bipolaris sorokiniana*, mancha borrosa del trigo

Valeria Valenzuela-Ruiz, ¹Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur, 85000 Ciudad Obregón, Sonora, Mexico; Fannie I. Parra-Cota, Campo Experimental Norman E. Borlaug, INIFAP, Norman E. Borlaug km 12, C.P. 85000 Ciudad Obregón, Sonora, México; Gustavo Santoyo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México; ¹Sergio de los Santos-Villalobos*.

*Corresponding author: sergio.delossantos@itson.edu.mx

Received: January 19, 2022.

Accepted: April 07, 2022.

Valenzuela-Ruiz V, Parra-Cota FI, Santoyo G and de los Santos-Villalobos S. 2022. Potential biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp. TSO2 against *Bipolaris sorokiniana*, spot blotch in wheat. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 230-239.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2201-1>

Primera publicación DOI: 19 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 19, 2022.

Abstract. *Bipolaris sorokiniana* is a pathogen of cereals such as wheat and barley, causing root rot, leaf blight, seedling blight, and spot blotch. This phytopathogen causes a considerable reduction in cereal yield of up to 85%. Thus, sustainable alternatives to the application of synthetic fungicides are determinants for the control of phytopathogens, such as the application of biological control agents. This study aims to identify the potential biocontrol mechanisms of the

Resumen. *Bipolaris sorokiniana* es un patógeno de cereales como el trigo y la cebada, que causa pudrición de la raíz, tizón de la hoja, tizón de la plántula y mancha borrosa. Este patógeno genera una reducción considerable en el rendimiento de cereales hasta en un 85%. Así, alternativas sostenibles a la aplicación de fungicidas sintéticos son determinantes para el control de fitopatógenos, como la aplicación de agentes de control biológico. El objetivo de este estudio es identificar los potenciales mecanismos de biocontrol de la cepa bacteriana TSO2, a través de la secuenciación, anotación y la minería de su genoma. El borrador del genoma de la cepa TSO2 se secuenció a través de la plataforma Illumina Miseq y presentó 4,242,212 pb, 43.9% de contenido de G+C, 300,069 pb N50, 5 L50, 47 contigs, 96 ARN y 4,432 secuencias de ADN codificantes (CDS, por sus siglas en inglés). Además, se detectó la presencia de 86 CDS de importancia agrícola involucrados en la virulencia, enfermedad, defensa, adquisición de hierro y metabolismo se-

bacterial strain TSO2 by sequencing, annotation, and mining its genome. The draft genome of strain TSO2 was sequenced through the Illumina Miseq platform and presented 4,242,212 bp, 43.9% G+C content, 300,069 bp N50, 5 L50, 47 contigs, 96 RNAs, and 4,432 predicted coding DNA sequences. Besides, the presence of 86 CDS of agricultural importance involved in virulence, disease, defense, iron acquisition, and secondary and phosphate metabolisms was detected. On the other hand, seven putative secondary metabolite gene clusters involved in biocontrol activity were identified in the genome of strain TSO2. *Bacillus* sp. TSO2 contains a great number of biosynthetic gene clusters which supports its biocontrol activity against phytopathogenic fungi. Thus, this strain needs to be further studied as a potential bioactive ingredient for the biopesticide formulation due to its high potential as a biological control agent.

Key words: Biological control agents, Genomics, antiSmash, biofungicide, sustainable agriculture.

Bipolaris sorokiniana is a pathogen of cereals, such as wheat (*Triticum turgidum*) and barley (*Hordeum vulgare*), causing root rot, leaf blight, seedling blight, and spot blotch. This disease affects seed germination and seedling emergence, generating a considerable reduction in yield of up to 85% (Mehta, 2014). Currently, disease management against *B. sorokiniana* is carried out through the foliar application of ergosterol biosynthesis disruptors from the triazole group, despite these being reported with harmful effects, such as soil contamination, inhibition of non-target organisms, and human cytotoxicity (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). In addition, this is strategy not only toxic to humans but also harmful to the environment and results in an imbalance within the

cundario y de fosfato. Por otro lado, se identificaron siete grupos de genes de metabolitos secundarios putativos en el genoma de la cepa TSO2. *Bacillus* sp. TSO2 contiene una gran cantidad de grupos de genes biosintéticos que favorece la actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos. Por lo tanto, esta cepa debe estudiarse más a fondo como un potencial ingrediente bioactivo para la formulación de bioplaguicidas, debido a su alto potencial como agente de control biológico.

Palabras clave. Agentes de control biológico, genómica, antiSmash, biofungicida, agricultura sostenible.

Bipolaris sorokiniana es un patógeno de cereales tales como el trigo (*Triticum turgidum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) y causante de pudrición de raíz, tizón foliar, tizón de la plántula y mancha borrosa. Esta enfermedad afecta la germinación de la semilla y la emergencia de la plántula, generando una reducción considerable en el rendimiento, de hasta 85% (Mehta, 2014). En la actualidad, el manejo de las enfermedades causadas por *B. sorokiniana* es llevado a cabo a través de la aplicación foliar de disruptores de la biosíntesis de ergosterol del grupo triazol, a pesar de reportes de efectos dañinos tales como la contaminación del suelo, la inhibición de organismos que no son objetivos y citotoxicidad humana (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). Además, esta estrategia no es solo tóxica para humanos, sino también para el ambiente y resulta en un desbalance de la comunidad microbiana del suelo y un rápido aumento en la propagación de genes de resistencia (Ahmad *et al.*, 2018). Así, las alternativas sustentables a la aplicación de fungicidas sintéticos son decisivas para el control de fitopatógenos, tales como la aplicación de agentes de control biológicos.

soil microbial community and a rapid increase in the spread of resistance genes (Ahmad *et al.*, 2018). Thus, sustainable alternatives to the application of synthetic fungicides are determinants for the control of phytopathogens, such as the application of biological control agents.

Currently, the most studied, produced, and commercialized bacterial biological control agents are the *Bacillus* species, due to its high efficacy, safety, and ability to form spores, allowing it to prevail in most agroecosystems (Villareal-Delgado *et al.*, 2018; Córdova-Albores *et al.*, 2020). Thus, this study aims to identify the potential biocontrol mechanisms of the bacterial strain TSO2 by sequencing, annotation, and mining its genome to explore the use of this strain for biopesticides formulation.

In this way, strain TSO2 was isolated from the soil where durum wheat was planted commercially, in the Yaqui Valley, Mexico (27.3692°, 110.3886°), using a serial dilution method in Nutrient Agar (NA) culture medium at 28 °C for 2 days (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018). After bacterial purification, this strain was cryopreserved, at -80 °C by using Nutrient Broth (NB) culture medium supplemented with 30% glycerol, in the Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2021). After purification, an agar plug of 0.5 cm diameter of *Bipolaris sorokiniana* TPQ3 mycelia was placed in the center of a Petri dish containing Potato Dextrose Agar (PDA), and strain TSO2 was inoculated at four equidistant points by triplicate around the phytopathogen and incubated for five days at 28 °C. Thus, strain TSO2 showed great biocontrol activity against *B. sorokiniana* TPQ3, inhibition zone of 8.0 ± 0.2 mm, through the production of extracellular diffusible compounds with strong antifungal activity, and cytotoxic activity (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019).

Hoy en día, los agentes de control biológicos más estudiados, producidos y comercializados son las especies de *Bacillus*, debido a su alta eficacia, seguridad y habilidad de formar esporas, lo cual le permite prevalecer en la mayoría de los agroecosistemas (Villareal-Delgado *et al.*, 2018; Córdova-Albores *et al.*, 2020). Así, el objetivo del presente estudio fue identificar los potenciales mecanismos de biocontrol de la cepa bacteriana TSO2 al secuenciar, anotar y minar su genoma para explorar el uso de esta cepa para la formulación de biopesticidas.

Así, se aisló la cepa TSO2 del suelo en el que se encontraba plantado trigo duro comercial en el Valle del Yaqui, México (27.3692°, 110.3886°), con un método de dilución serial en el medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) a 28 °C por 2 días (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018). Después de la purificación bacteriana, la cepa fue criopreservada a -80 °C con Caldo Nutritivo (CN) como medio de cultivo suplementado con 30% de glicerol, en la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2021). Después de la purificación, se colocó una pieza de agar de 0.5 cm de diámetro con micelio de *Bipolaris sorokiniana* TPQ3 en el centro de una caja de Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), y la cepa TSO2 se sembró en cuatro puntos equidistantes por triplicado alrededor del fitopatógeno y se incubó por cinco días a 28 °C. Así, la cepa TSO2 mostró una gran actividad de biocontrol contra *B. sorokiniana* TPQ3, una zona de inhibición de 8.0 ± 0.2 mm, a través de la producción de compuestos difusibles extracelulares con una fuerte actividad antifúngica, así como actividad citotóxica (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019).

Con base en estos hallazgos, la cepa TSO2 fue secuenciada para explorar más a fondo potenciales mecanismos de biocontrol. Se extrajo ADN genómico de alta calidad de un cultivo fresco de esta cepa sembrado en CN [24 h a 32 °C, usando

Based on these findings, strain TSO2 was sequenced to further explore potential biocontrol mechanisms. High-quality genomic DNA was extracted from a fresh culture of this strain grown in NB [24 h at 32 °C, using an orbital shaker at 121 rpm, obtaining 1×10^6 Colony Forming Units (CFU) mL^{-1}], and following the protocol described by Valenzuela-Aragon *et al.* (2018). Then, the bacterial DNA was sequenced by the Illumina MiSeq platform, obtaining a total of 3,584,209 total pair-end reads [2 x 300 base pairs (bp)]. The quality of the obtained reads was analyzed by FastQC version 0.11.5 (Andrews, 2010). Trimmomatic version 0.32 (Bolger *et al.*, 2014) was used to remove adapter sequences and low-quality bases, only 7.39% was dropped. Subsequently, *de novo* assembly was generated by SPAdes version 3.14.1 (Bankevich *et al.*, 2012), using the "--careful" parameter for error correction in reads. The assembled contigs were ordered by Mauve contig Mover version 2.4.0 (Darling *et al.*, 2004), using the reference genome of *Bacillus cabrialesii* TE3^T (Genebank accession number GCA_004124315.1) (de los Santos Villalobos *et al.*, 2019), based on the highest similarity of the 16S rRNA gene, with 100% similarity and 100% completeness (Figure 1). In addition, plasmid detection was carried out by PlasmidFinder 2.0 (Carattoli *et al.*, 2014), where no plasmids were detected. Thus, the draft genome of strain TSO2 presented 4,242,212 bp; 43.9% G+C content; 300,069 bp N50; 5 L50; and 47 contigs (> 200bp).

The genome annotation of the studied strain was created through Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) server version 2.0 (<http://rast.nmpdr.org>) (Overbeek *et al.*, 2013), by the default RASTtk pipeline (Figure 2). Thus, strain TSO2 showed a total of 96 RNAs and 4,432 predicted coding DNA sequences (CDS) distributed into 328 subsystems. The most abundant subsystem was

un agitador orbital a 121 rpm, con lo que se obtuvo 1×10^6 Unidades Formadoras de Colonias (CFU, por sus siglas en inglés) mL^{-1}], y siguiendo el protocolo descrito por Valenzuela-Aragon *et al.* (2018). Luego, el ADN bacteriano fue secuenciado en la plataforma Illumina MiSeq, con lo que se obtuvo un total de 3,584,209 de lecturas pareadas [2 x 300 pares de bases (bp, por sus siglas en inglés)]. La calidad de las lecturas obtenidas fue analizada en FastQC versión 0.11.5 (Andrews, 2010). Se usó Trimmomatic versión 0.32 (Bolger *et al.*, 2014) para remover secuencias del adaptador y bases de baja calidad; solamente 7.39% de éstas no cumplieron los criterios de calidad. Después, se generó un ensamble *de novo* con SPAdes versión 3.14.1 (Bankevich *et al.*, 2012), usando el parámetro "--careful" para la corrección de errores en las lecturas. Los contigs ensamblados fueron ordenados con Mauve contig Mover, versión 2.4.0 (Darling *et al.*, 2004), utilizando el genoma de referencia de *Bacillus cabrialesii* TE3^T (número de acceso de Genebank GCA_004124315.1) (de los Santos Villalobos *et al.*, 2019), con base en la mayor similitud del gen 16S rRNA (100% de similitud y una completud de 100%) (Figura 1). Además, se llevó a cabo una detección de plásmidos con PlasmidFinder 2.0 (Carattoli *et al.*, 2014), los cuales no se detectaron. Así, el borrador del genoma de la cepa TSO2 presentó 4,242,212 bp; contenido de G+C de 43.9%; 300,069 bp N50; 5 L50 y 47 contings (> 200bp).

La anotación del genoma de la cepa estudiada se creó a través del servidor Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) versión 2.0 (<http://rast.nmpdr.org>) (Overbeek *et al.*, 2013), usando RASTtk por defecto (Figura 2). Así, la cepa TSO2 presentó un total de 96 RNAs y 4,432 secuencias de ADN codificantes (CDS) predichos, distribuidos en 328 subsistemas. Los subsistemas más abundantes fueron los aminoácidos y derivados (307 CDS), seguidos de hidratos de carbono (252 CDS). Este

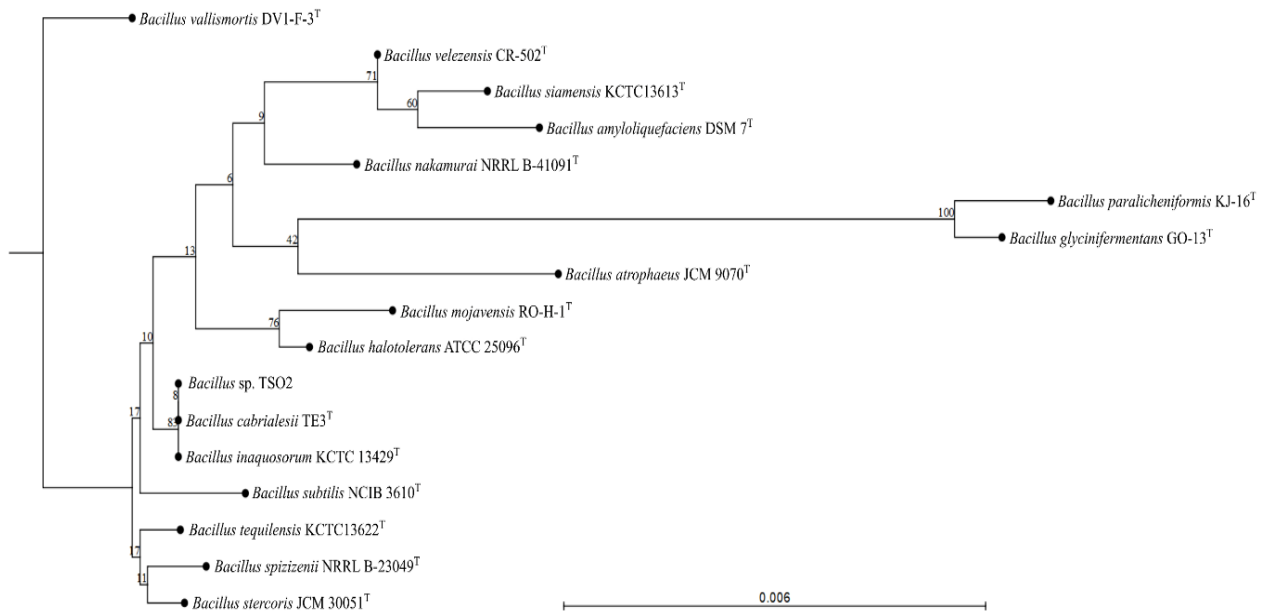


Figure 1. Phylogenetic Tree. Phylogenetic relation between strain TSO2 and closely related species: *Bacillus inaquosorum* KCTC 13429^T (AMXN01000021); *B. cabrialesii* TE3^T (MK462260); *B. spizizenii* NRRL B-23049^T (CP002905); *B. tequilensis* KCTC13622^T (AYTO0100004); *B. stercoris* JCM 30051^T (MN536904); *B. subtilis* NCIB 3610^T (ABQL01000001); *B. halotolerans* ATCC 25096^T (LPVF01000003); *B. mojavensis* RO-H-1^T (JH600280); *B. vallismortis* DV1-F-3^T (JH600273); *B. nakamurai* NRRL B-41091^T (JH600273); *B. velezensis* CR-502^T (AY603658); *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T (FN597644); *B. siamensis* KCTC13613^T (AJVF01000043); *B. atrophaeus* JCM 9070^T (AB021181); *B. glycinifermentans* GO-13^T (LECW01000063); *B. paralicheniformis* KJ-16^T (KY694465), constructed by CLC Sequence Viewer v8.0.0 (CLC bio A/S, Qiagen, Denmark) using the neighbor-joining algorithm (based on 1000 bootstrap replications). Scale bar (0.006) represents the number of nucleotide substitutions per site.

Figura 1. Árbol filogenético. Relación filogenética entre la cepa TSO2 y especies con una relación cercana: *Bacillus inaquosorum* KCTC 13429^T (AMXN01000021); *B. cabrialesii* TE3^T (MK462260); *B. spizizenii* NRRL B-23049^T (CP002905); *B. tequilensis* KCTC13622^T (AYTO0100004); *B. stercoris* JCM 30051^T (MN536904); *B. subtilis* NCIB 3610^T (ABQL01000001); *B. halotolerans* ATCC 25096^T (LPVF01000003); *B. mojavensis* RO-H-1^T (JH600280); *B. vallismortis* DV1-F-3^T (JH600273); *B. nakamurai* NRRL B-41091^T (JH600273); *B. velezensis* CR-502^T (AY603658); *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T (FN597644); *B. siamensis* KCTC13613^T (AJVF01000043); *B. atrophaeus* JCM 9070^T (AB021181); *B. glycinifermentans* GO-13^T (LECW01000063); *B. paralicheniformis* KJ-16^T (KY694465), construido con CLC Sequence Viewer v8.0.0 (CLC bio A/S, Qiagen, Dinamarca) por medio del algoritmo de unión de vecinos (con base en 1000 replicaciones). La barra de escala (0.006) representa el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

amino acids and derivatives (307 CDS), followed by carbohydrates (252 CDS). This genome showed the presence of agricultural importance genes involved in i) virulence, disease, and defense (34 CDS), which include bacitracin stress response (7 CDS), resistance to antibiotics and toxic compounds (15 CDS), and invasion and intracellular resistance (12 CDS); and ii) iron acquisition and metabolism (30 CDS), including siderophores Bacillibactin (10 CDS) and Anthrachelin (5 CDS).

genoma demostró la presencia de genes de importancia agrícola involucrados en i) virulencia, enfermedad y defensa (34 CDS), que incluye la respuesta al estrés por bacitracina (7 CDS), resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos (15 CDS), así como a invasión y resistencia intracelular (12 CDS); y ii) adquisición y metabolización del hierro (30 CDS), incluyendo a los sideróforos Bacillibactina (10 CDS) y Antraquelina (5 CDS).

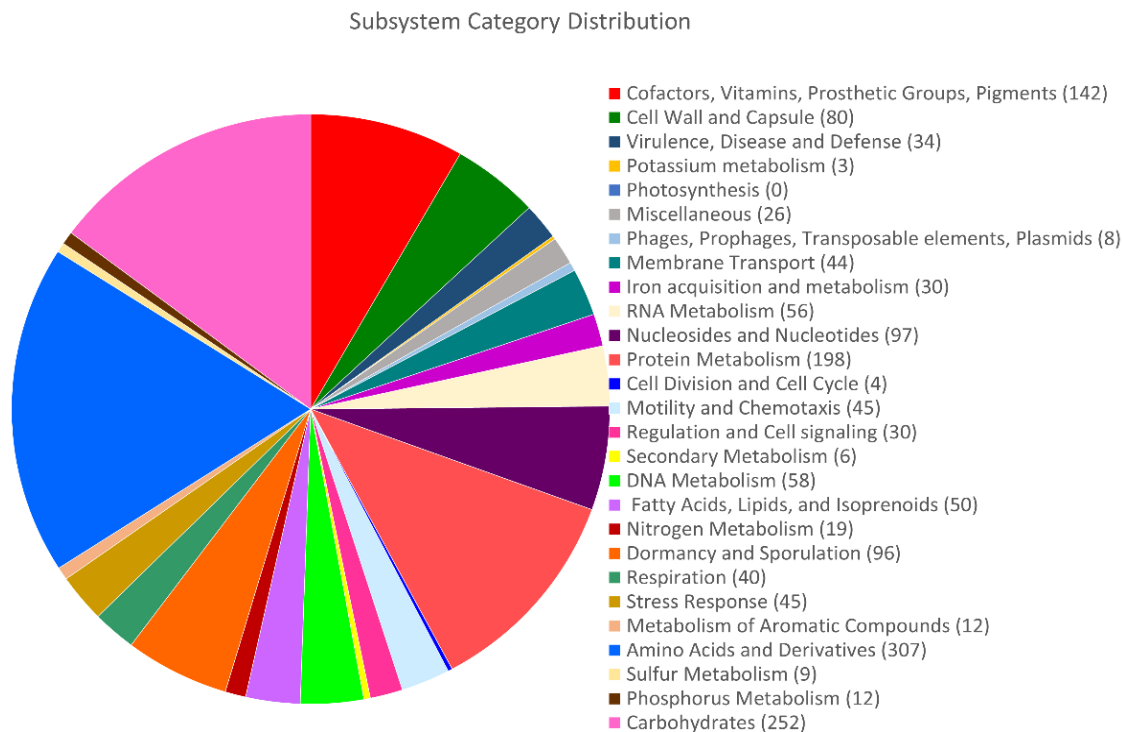


Figure 2. Coding sequences subsystem distribution from strain TSO2 generated through RASTtk pipeline. CDS: 4432, CDS in subsystems: 1204, and subsystems: 328.

Figura 2. Distribución de los subsistemas de secuencias de ADN codificantes de la cepa TSO2 generada a través deRASTtk. CDS: 4432, CDS en subsistemas: 1204, y subsistemas: 328.

Besides, the circular chromosome map was generated using the CGView Server (Grant and Stothard 2008) (Figure 3). In addition, using antiSMASH 5.2.0 under default parameters (Blin *et al.*, 2021), seven putative Biosynthetic Gene Clusters (BGC) were identified in the genome of strain TSO2 (Figure 3). For example i) Fengycin (100%), which is a lipopeptide with strong fungitoxic activity against filamentous fungi (Koumoutsis *et al.*, 2004); ii) Bacilysin (100%), a dipeptide with an impressively broad range of antagonistic activity against fungi and bacteria (Nannan *et al.*, 2021); iii) Subtilisin A (100%), a bacteriocin ribosomally produced with potent antimicrobial property (Ezrari *et al.*, 2021); iv) Bacillibactin (100%), an archetypal triscatetholate

Además, el mapa circular de cromosomas fue generado con el CGView Server (Grant y Stothard 2008) (Figura 3). Asimismo, con el uso de antiSMASH 5.2.0 bajo parámetros por defecto (Blin *et al.*, 2021), siete grupos de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés) putativos fueron identificados en el genoma de la cepa TSO2 (Figura 3). Por ejemplo i) la fengicina (100%), que es un lipopéptido con una fuerte actividad fungitóxica contra los hongos filamentosos (Koumoutsis *et al.*, 2004); ii) la bacilisina (100%), un dipéptido con un rango amplio de actividad antagonista contra hongos y bacterias (Nannan *et al.*, 2021); iii) la subtilosina A (100%), una bacteriocina producida de forma ribosomal con una potente propiedad antimicrobiana (Ezrari *et al.*, 2021); iv) la bacilibactina (100%), un

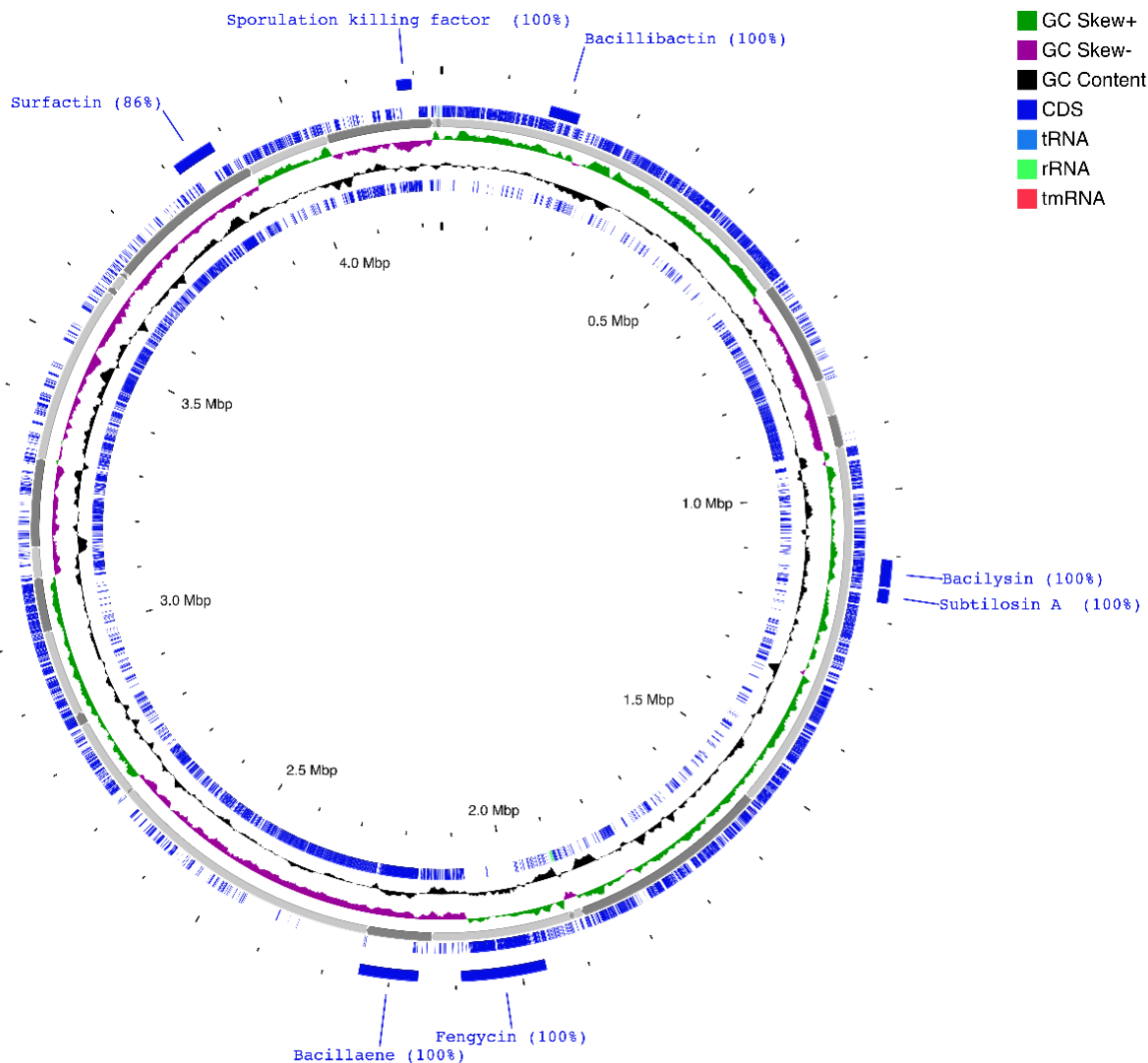


Figure 3. Circular Chromosome Map of *Bacillus* sp. strain TSO2, distribution of coding DNA sequences (CDS), tRNAs, rRNAs, and GC content skew (50% of the total base-pair window), as well as the Biosynthetic Gene Clusters (BGC) identified through antiSMASH.

Figura 3. Mapa circular del cromosoma de *Bacillus* sp. cepa TSO2, distribución de secuencias de ADN codificantes (CDS), tRNAs, rRNAs, y contenido de GC (50% de las pares de base), así como los grupos de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés) identificados a través de antiSMASH.

siderophore known for its highest affinity for iron (Fe^{3+}) of natural siderophores (Nithyapriya *et al.*, 2021); v) Bacillaene (100%), a polyketide which has an important biological role associated as antibiotic weapons for *Bacillus* to resist other environmental microbes (Li *et al.*, 2021); vi) Killing factor (100%), a peptide that induces the

sideróforo triscatetolato arquetípico conocido por su gran afinidad por el hierro (Fe^{3+}) de sideróforos naturales (Nithyapriya *et al.*, 2021); v) el bacilaeno (100%), un policétido que juega un papel biológico importante relacionado como arma antibiótica para que *Bacillus* pueda resistir otros microbios ambientales (Li *et al.*, 2021); vi) Killing factor (100%),

lysis of sibling no-sporulated and non-exogenous toxin resistant cells for nutrient resource, this providing the species a favorable trait in regards to sporulation, and hence competence in the niche (González-Pastor, 2010); and vii) Surfactin (86%), which is a powerful lipopeptide biosurfactant and a versatile bioactive molecule that has demonstrated antifungal, antiviral, antitumor, insecticide, antimycoplasma, and bioremediation agents in soil and water (Mulligan, 2005).

Bacillus sp. strain TSO2 contains a great number of Biosynthetic Gene Clusters (BGC) which support its biocontrol activity against phytopathogenic fungi. Thus, this strain needs to be further studied as a potential bioactive ingredient for the biopesticides formulation due to its high potential as a biological control agent by the secretion of antibiotics and antimicrobial peptides, and the production of siderophores.

Data availability. This draft genome sequence has been deposited in DDBJ/ENA/ GenBank under accession number JAHBMK000000000. The version described in this paper is the first version, JAHBMK000000000, under BioProject number PRJNA728132 and BioSample number SAMN19070894. Raw data is available under accession number SRR16775344.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge support by the CONACyT Project 257246 “Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agrobiotecnológico”. We acknowledge funding from the Instituto Tecnológico de Sonora (PROFAPI_2022_0001) “Minería del genoma de *Bacillus* sp. TS02 para la identificación de genes asociados al control biológico de hongos fitopatógenos” Valeria Valenzuela Ruiz was supported by CONACYT fellowship 924892.

un péptido que induce la lisis de células hermanas no esporuladas y no exógenas resistentes a toxinas como fuente de nutrientes, con lo cual brinda a la especie con un rasgo favorable en cuanto a la esporulación, y por ello, a la competencia en el nicho (González-Pastor, 2010); y vii) la surfactina (86%), que es un poderoso biosurfactante y una molécula bioactiva versátil que ha demostrado ser un agente antifúngico, antiviral, antitumoral, insecticida, antimicoplasma y biorremediación en el suelo y en el agua (Mulligan, 2005).

Bacillus sp. cepa TSO2 contiene un gran número de grupos de genes biosintéticos (BGC) que apoyan su actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos. Así, esta cepa debe ser estudiada a mayor profundidad como un potencial ingrediente bioactivo para la formulación de biopesticidas, debido a su gran potencial como agente de control biológico por la secreción de antibióticos y de péptidos antimicrobiales, así como la producción de sideróforos.

Disponibilidad de datos. Este borrador de secuencia del genoma ha sido depositada en DDBJ/ENA/ GenBank bajo el número de acceso JAHBMK000000000. La versión descrita en el presente trabajo es la primera versión, JAHBMK000000000, bajo el número de BioProject PRJNA728132 y número de BioSample SAMN19070894. Datos sin procesar están disponibles bajo el número de acceso SRR16775344.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Proyecto 257246 del CONACyT “Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agrobiotecnológico”, así como el apoyo por parte del Instituto Tecnológico de Sonora al proyecto PROFAPI_2022_0001

LITERATURE CITED

- Ahmad M, Pataczek L, Hilger TH, Zahir ZA, Hussain A, Rasche F, Schafleitner R and Solberg SØ. 2018. Perspectives of Microbial Inoculation for Sustainable Development and Environmental Management. *Frontiers in Microbiology* 9:2992. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02992>
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. (Consulted October 2021).
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SL, Pham s, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal Computational Biology* 19(5):455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH and Weber T. 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* 49(w1): w39-w45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Aarestrup FM and Hasman H. 2014. PlasmidFinder and pMLST: *in silico* detection and typing of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 58(7):3895–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Córdova-Albores LC, Zelaya-Molina LX, Ávila-Alistac N, Valenzuela-Ruiz V, Cortés-Martínez NE, Parra-Cota FI, Burgos-Canul YY, Chávez-Díaz IF, Fajardo-Franco ML, de los Santos-Villalobos S. 2020. Omics Sciences Potential on Bioprospecting of Biological Control Microbial Agents: The Case of the Mexican Agro-Biotechnology. *Mexican Journal of Phytopathology* 39: 1–38. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2009-3>.
- Darling AC, Mau B, Blattner FR and Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* 14(7):1394-1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrea-Sepulveda A, Valenzuela-Aragon B y Estrada-Mora JC. 2018. Colmena: colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(1): 191-202. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- de los Santos-Villalobos S, Díaz-Rodríguez AM, Ávila-Mascareño MF, Martínez-Vidales AD, Parra-Cota FI. 2021. COLMENA: A Culture Collection of Native Microorganisms for Harnessing the Agro-Biotechnological Potential in Soils and Contributing to Food Security. *Diversity* 13: 1-13. <https://doi.org/10.3390/d13080337>
- de los Santos-Villalobos S, Robles RI, Parra-Cota FI, Larsen J, Lozano P and Tiedje JM. 2019. *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) “Minería del genoma de *Bacillus* sp. TS02 para la identificación de genes asociados al control biológico de hongos fitopatógenos”. Valeria Valenzuela Ruiz recibió el apoyo del CONACYT mediante la beca de investigación 924892.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- in the Yaqui Valley, Mexico. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 69(12). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>
- Ezrari S, Mhidra O, Radouane N, Tahiri A, Polizzi G, Lazraq A, Lahlali R. 2021. Potential Role of Rhizobacteria Isolated from Citrus Rhizosphere for Biological Control of Citrus Dry Root Rot. *Plants* 10 (872): 1-25. <https://doi.org/10.3390/plants10050872>
- González-Pastor J. 2010. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00253.x>
- Grant JR and Stothard P. 2008. The CGView server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* 36:W181–W184. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn179>.
- Koumoutsis A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J and Borriss R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 186: 1084–1096. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- Li H, Han X, Dong Y, Xu S, Chen C, Feng Y, Cui Q and Li W. 2021. Bacillaenes: Decomposition Trigger Point and Biofilm Enhancement in *Bacillus*. *ACS Omega* 6: 1093–1098. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03389>
- Mehta YR. 2014. Foliar and stem diseases. 133–216p. *In: Mehta YR. (Ed.). Wheat diseases and their management.* Springer, Cham.
- Mulligan CN. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* 133: 183–198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Nannan C, Vu HQ, Gillis A, Caulier S, N TTT and Mahillo J. 2021. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against Gram-negative foodborne pathogens. *Journal of Biotechnology* 327: 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.017>
- Nithyapriya S, Lalitha S, Sayyed RZ, Reddy MS, Dailin DJ, El Enshasy HA, Luh Suriani N and Herlambang S. 2021. Production, Purification, and Characterization of Bacillibactin Siderophore of *Bacillus subtilis* and Its Application for Improvement in Plant Growth and Oil Content in Sesame. *Sustainability* 13: 5394. <https://doi.org/10.3390/su13105394>

- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T. *et al.*, 2013. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42: D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G, Arellano-Wattenbarger GL, de Los Santos-Villalobos S. 2018. Plant assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. *Plant Soil* 435:367-384.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De los Santos Villalobos S. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1):95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Villa-Rodríguez E, Parra-Cota FI, Castro-Longoria E, López-Cervantes J and de los Santos-Villalobos S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control* 132:135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>

Disinfectants effectiveness in *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) transmission in tobacco plants

Efectividad de desinfectantes en la transmisión del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en plantas de tabaco

Cinthia Iraís Rodríguez-Díaz, Erika Janet Zamora-Macorra*, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5, carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230; Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Fitosanidad- Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230; Ramiro González-Garza, BioCiencia S.A. de C.V. Agustín Melgar 2317 Norte, colonia Monterrey, Nuevo León, México Reforma. C.P. 64550.

*Corresponding author: erikazam@gmail.com.

Received: November 15, 2022.

Accepted: April 12, 2022.

Rodríguez-Díaz CI, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL and González-Garza R. 2022. Disinfectants effectiveness in *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) transmission in tobacco plants. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 240-253.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2111-2>

Primera publicación DOI: 20 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 20, 2022.

Abstract. The importance of the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in the tomato and pepper crops in the world has created the need to investigate and test alternatives for its management. Preventive tactics are the best option to manage a viral disease, so the objective of this study was to evaluate the effectiveness of sodium hypochlorite, ethyl alcohol, quaternary ammonium salts, liquid soap and milk powder dissolved in water, applied by spraying and immersion of razor blades infested with the virus and inoculating mechanically on *Nicotiana rustica* and *N. benthamiana* leaves. A completely randomized design with five repetitions

Resumen. La importancia del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en el cultivo de jitomate y pimiento ha creado la necesidad de investigar y probar alternativas para su manejo, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad del hipoclorito de sodio, alcohol etílico, sales cuaternarias de amonio, jabón líquido y leche en polvo disuelta en agua, aplicados por aspersión e inmersión en navajas infestadas con ToBRFV e inoculadas sobre *Nicotiana rustica* y *N. benthamiana*. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones y la unidad experimental fue el área de una hoja de tabaco delimitada por un rectángulo, la variable respuesta fue el número de lesiones locales/cm² (LC/cm²). Se utilizó un análisis no paramétrico y una prueba de Kruskal Wallis de comparación de medias para evaluar los tratamientos, encontrando diferencias significativas ($J_i < .0001$). El hipoclorito de sodio (aspersión) y la posterior aplicación de la leche evitaron la aparición de lesiones locales y la transmisión del ToBRFV. Mientras que los peores tratamientos fueron el

was used and the experimental unit was the area of a tobacco leaf delimited by a rectangle, and the response variable was the number of local lesions/cm² (LL/cm²). A non-parametric analysis and a Kruskal Wallis test for comparison of means were used to evaluate the treatments, and significant differences were found ($J_i < .0001$). Sodium hypochlorite (spraying) and the subsequent application of milk prevented the appearance of local lesions and the transmission of ToBRFV. While the worst treatments were ethyl alcohol (immersion) with an average of 12 LL/cm², and quaternary ammonium salts (immersion) with 3.22 LL/cm². The rest of the treatments significantly reduced the number of LL/cm² (<1), but did not prevent the appearance of systemic symptoms in the inoculated plants.

Key words: Tobamovirus, milk, sodium hypochlorite, preventive management, spraying, immersion.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) crop is of worldwide importance due to its consumption, both fresh and processed. In 2019, a total of 243,635,433 tons were harvested worldwide (FAO, 2021; Foolad and Panthee, 2012). However, in recent years, its production has been reduced by the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), which was first reported in 2014 in Israel in tomato plants (Luria *et al.*, 2017) and in 2015 in Jordan (Salem *et al.*, 2016). From that time onwards, ToBRFV has been found in practically all tomato-producing countries (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018, Menzel *et al.*, 2019; Fidan *et al.*, 2019; Skelton *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2019; Alkowni, 2019; EPPO, 2019a,b; MAA, 2020). In 2018 it was also found in pepper plantations in Mexico (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018) and since

alcohol étílico (inmersión) con un promedio de 12 LC/cm² y las sales cuaternarias de amonio (inmersión) con 3.22 LC/cm². El resto de los tratamientos redujeron significativamente el número de LC/cm² (<1), pero no evitaron la aparición de síntomas sistémicos en las plantas inoculadas.

Palabras clave: Tobamovirus, leche, hipoclorito de sodio, manejo preventivo, aspersion, inmersión.

El cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza de importancia mundial por su consumo en fresco y procesados. En 2019 se cosecharon 243 635 433 toneladas a nivel mundial (FAO, 2021; Foolad y Panthee, 2012). Sin embargo, en años recientes su producción se ha visto reducida por el *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), el cual fue reportado por primera vez en 2014 en Israel en plantas de jitomate (Luria *et al.*, 2017) y en el 2015 en Jordania (Salem *et al.*, 2016). A partir de esa fecha, el ToBRFV se ha detectado prácticamente en todos los países productores de jitomate (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018, Menzel *et al.*, 2019; Fidan *et al.*, 2019; Skelton *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2019; Alkowni, 2019; EPPO, 2019a,b; MAA, 2020). En 2018 se detectó también en cultivos de pimiento en México (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018) y a partir de 2020 se ha reportado en invernaderos de pimiento en Italia y Jordania (Salem, 2020; Panno, 2020a).

El ToBRFV es un tobamovirus con partículas en forma de varilla rígida, su genoma es de ARN de cadena sencilla de sentido positivo (+ssARN) y se compone de cuatro marcos de lectura abiertos (ORFs). El ORF1 y ORF2 codifican la ARN polimerasa-ARN dependiente; el ORF3 codifica la proteína de movimiento y el ORF4, de menor tamaño, codifica la proteína de cubierta (Luria *et*

2020, it has been reported in pepper greenhouses in Italy and Jordan (Salem, 2020; Panno, 2020a).

ToBRFV is a tobamovirus with particles shaped like a stiff rod, its genome is positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) and it is composed of four open reading frames (ORFs). ORF1 and ORF2 codify RNA polymerase-RNA dependent; ORF3 codifies movement protein and ORF4, of a smaller size, codifies the coat proteins (Luria *et al.*, 2017). This virus is easily transmitted by mechanical means, since its particles are very stable, therefore the cultural work implied by the manipulation of plants with tools or hands are the main means of virus spread in greenhouses (Levitzky *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2020b). In addition, it is widely known that bumblebees (*Bombus terrestris*) are potential transmitters of the ToBRFV during pollination (Levitzky *et al.*, 2019) and in the tomato, the virus has a low transmission rate via seeds (Salvatore *et al.*, 2020).

Although the transmission of the virus by seed is low, the practices of grafting, transplanting seedlings, and the different types of cultural work in general allow for its quick dissemination (Salem *et al.*, 2016). Under experimental tomato production conditions in a greenhouse, it was proven that, with an incidence of 1.45% of plants infected with ToBRFV at the beginning of the productive cycle, the crop management favored dissemination and in only 4 months, 80% of the plants were infected and by the end of the cycle, this figure increased to 100% (Panno *et al.*, 2020b). The efficient management of the ToBRFV requires the identification and application of a series of phytosanitary practices in protected crops, such as the use of certified propagation material, rapid diagnose techniques and the removal of infected plants, among others (Panno *et al.*, 2020b). A preventive, continuous and efficient cultural practice is to disinfect cutting tools to prevent the mechanical transmission of

et al., 2017). Este virus se transmite fácilmente de forma mecánica ya que sus partículas son muy estables, por lo que las labores culturales que impliquen manipular las plantas con herramientas o las manos, son la principal forma de diseminación en los invernaderos (Levitzky *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2020b). Además, se sabe que los abejorros (*Bombus terrestris*) son dispersores potenciales del ToBRFV durante la polinización (Levitzky *et al.*, 2019) y en jitomate el virus tiene una baja transmisión por semilla (Salvatore *et al.*, 2020).

Aunque la transmisión del virus de semilla a plántula sea baja, las prácticas de injerto, trasplante de plántulas y las diferentes labores culturales en general permitirán su rápida propagación (Salem *et al.*, 2016). En condiciones experimentales de producción de jitomate bajo invernadero, se demostró que con una incidencia del 1.45% de plantas infectadas con ToBRFV al inicio del ciclo productivo, el manejo del cultivo favoreció la dispersión y en solo 4 meses el 80% de las plantas estaban infectadas, y para el fin del ciclo el 100% (Panno *et al.*, 2020b). El manejo eficiente del ToBRFV requiere identificar y aplicar una combinación de prácticas fitosanitarias en cultivos protegidos, como el uso de material de propagación certificado, técnicas rápidas de diagnóstico y la eliminación de plantas infectadas, entre otras (Panno *et al.*, 2020b). Una práctica cultural preventiva, continua y eficiente es desinfectar herramientas de corte para prevenir la transmisión mecánica de virus. De manera general, se recomienda que los desinfectantes utilizados sean: económicos, de disponibilidad inmediata, efectivos, confiables, inocuos para la gente, las plantas y el ambiente, de acción rápida (menos de un minuto), estables en las condiciones ambientales del invernadero, que su uso sea legal y con un amplio espectro (Chase, 2014). Con base en lo anterior, se realizó el presente estudio con el objetivo de evaluar el efecto de cinco desinfectantes en

viruses. In general terms, it is recommended that disinfectants be cheap, readily available, effective, reliable, innocuous for humans, plants and the environment, quickly acting (under one minute), stable in the environmental conditions of the greenhouse, and that its use is legal and with a broad spectrum (Chase, 2014). Based on this, the present study was carried out with the aim of evaluating the effect of five disinfectants on the ineffectiveness of the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), under greenhouse conditions.

This investigation was carried out and the laboratory and greenhouse belonging to the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, in the 2020.

Source of inoculant. The inoculum source was taken from the foliar tissue of a tomato plant (*S. lycopersicum*) that had previously tested positive to ToBRFV by RT-PCR. With the tissue, a *Nicotiana glutinosa* plant was mechanically inoculated and local necrotic lesions were formed. One of these lesions was cut and used to inoculate a second *N. glutinosa* plant; the latter process was carried out twice. A local lesion of the fourth *N. glutinosa* plant was used to inoculate a tomato plant and 30 days later, it was analyzed by RT-PCR to verify the presence of the ToBRFV. Next, the inoculum source was increased, and for this, 2 g of tomato leaves infected with ToBRFV were macerated in a phosphate buffer at pH 7.0. The macerate was rubbed with a cotton swab on the first two true leaves of three tomato seedlings previously dusted with carborundum 400 mesh. Later, the inoculated leaves were rinsed with sterile distilled water. The plants were inspected visually every 24 hours until the appearance of systemic symptoms, typical of the ToBRFV.

Analysis by RT-PCR of the source of inoculant. The infection of the ToBRFV in the inoculated

la infectividad del *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), bajo condiciones de invernadero.

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero pertenecientes al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, durante el 2020.

Fuente de inóculo. El inóculo se obtuvo a partir de tejido foliar de jitomate (*S. lycopersicum*) positivo a ToBRFV mediante RT-PCR. Con el tejido se inoculó mecánicamente una planta de *Nicotiana glutinosa* y se formaron lesiones locales necróticas. Una de estas lesiones locales se cortó y con ella se inoculó una segunda planta de *N. glutinosa*; este último proceso se repitió dos veces. Una lesión local de la cuarta planta de *N. glutinosa* se utilizó para inocular una planta de jitomate y 30 días después se analizó mediante RT-PCR para verificar la presencia del ToBRFV. Posteriormente, se incrementó el inóculo para lo cual se maceraron 2 g de hojas de jitomate infectadas con ToBRFV en buffer de fosfatos pH 7.0. El macerado se frotó con un hisopo sobre las primeras dos hojas verdaderas de tres plántulas de jitomate previamente espolvoreadas con carborundum 400 mallas. Posteriormente, las hojas inoculadas se enjuagaron con agua destilada estéril. Las plantas se inspeccionaron visualmente cada 24 horas hasta la aparición de síntomas sistémicos típicos del ToBRFV.

Análisis por RT-PCR de la fuente de inóculo. La infección del ToBRFV en las plantas inoculadas se verificó mediante RT-PCR. Para ello, se extrajo el ARN total a partir de 0.1 g del material vegetal. Se utilizó Trizol[®] siguiendo la metodología descrita por Jordon-Thaden y colaboradores (2015), usando nitrógeno líquido como disruptor de membranas. La calidad y cantidad del ARN extraído se verificó y cuantificó con un Nanodrop 2000[®]. El ARN total se ajustó a 300 ng μL^{-1} y se utilizó 1 μL para realizar RT-PCR con los oligos y protocolos descritos

plants was verified by RT-PCR. In order to carry this out, the total RNA was extracted from 0.1 g of the plant material. Trizol[®] was used following the method described by Jordon-Thaden and collaborators (2015), with liquid nitrogen as a membrane disruptor. The quality and quantity of the RNA extracted was verified and quantified with a Nanodrop 2000[®]. The total RNA was adjusted to 300 ng μL^{-1} and 1 μL was used to perform a RT-PCR with the oligos and protocols described by Cambrón and collaborators (2018). The products of the RT-PCR were charged in a 1.5% agarose gel and electrophoresis was performed. The fragments were verified under UV light to be within the expected weight (450 pb) and they were purified with EXO-SAP[®] following the instructions by the manufacturer. The purified products were sent to be sequenced to Macrogen, Korea. Total RNA of ToBRFV infected plants got from the virus bank of the integral phytosanitary diagnose laboratory was used as a positive control. Sterile distilled water was used as a negative control for the RT-PCR reaction.

Nursery beds, transplanting and establishing nicotianas. Three *N. benthamiana* and *N. rustica* nursery beds were established in 1 L plastic containers with vermiculite substrate. Seeds of each one of the species were sown broadcast and the surface of the containers was covered with plastic film. The *N. rustica* seedbed was put in a sunny place to obtain a higher percentage of germination, and the *N. benthamiana* seedbed was kept in complete darkness until seedling emergence. When the seedling displayed two true leaves, three to four seedlings of each plant species were transplanted into 1 L styrofoam cups with sterilized Peat moss substrate, and were later placed in cages to avoid the presence of putative insects, vectors of other viruses. Six weeks later, thinning was carried out, leaving only two vigorous and developed plants.

por Cambrón y colaboradores (2018). Los productos de RT-PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% y se realizó electroforesis. Se verificó bajo luz UV que los fragmentos estuvieran dentro del peso esperado (450 pb) y se purificaron con EXO-SAP[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se enviaron a secuenciar a Macrogen, Corea. Como control positivo se utilizó ARN proveniente de plantas infectadas con ToBRFV existentes en el banco de virus del Laboratorio de diagnóstico integral fitosanitario. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril para la reacción de RT-PCR.

Almácigos, trasplante y establecimiento de nicotianas. Se establecieron tres almácigos de *N. benthamiana* y *N. rustica* en recipientes de plástico de 1 L con vermiculita como sustrato. Se sembraron al voleo semillas de cada una de las especies y se selló la superficie con hule para emplear. El almácigo de *N. rustica* se colocó en un lugar soleado, para tener mayor porcentaje de germinación, mientras que el de *N. benthamiana* se mantuvo en completa oscuridad hasta la emergencia de las plántulas. Cuando las plántulas presentaron dos hojas verdaderas, se trasplantaron de tres a cuatro plántulas de cada especie vegetal en vasos de unicel de 1 L de capacidad con Peat moss como sustrato, previamente esterilizado, y se colocaron en jaulas para evitar la presencia de insectos putativos vectores de otros virus. A las seis semanas se realizó el raleo, dejando sólo dos plantas vigorosas y desarrolladas.

Bioensayos

Preparación de las plantas de tabaco y fuente de inóculo. Cuando las plantas de nicotiana presentaron cinco hojas completamente desarrolladas se seleccionaron 2 o 3 hojas del estrato medio y en cada una de ellas se marcó un rectángulo con un marcador de tinta indeleble y se midió la base y

Bioassays

Preparation of tobacco plants and source of inoculant. When the nicotiana plants presented 5 fully developed leaves, 2 or 3 were selected from the mid-section and on each one of them, a rectangle was drawn using a permanent marker and the base and height was measured using a ruler to obtain the area. The experimental unit was the area defined by the rectangle drawn and for each treatment evaluated (Table 1), five rectangles were used. Every leaf was labelled with progressive numbers. Immediately afterwards, a maceration was prepared from tissue infected with ToBRFV in a phosphate buffer pH 7.0, and the maceration was divided into equal parts to inoculate *N. rustica* and *N. benthamiana*, respectively.

Disinfection of blades and mechanical inoculation. The marked areas of the leaves to

altura con ayuda de una regla para obtener así el área. La unidad experimental fue el área delimitada por el rectángulo marcado y por cada tratamiento evaluado (Cuadro 1), se utilizaron cinco rectángulos. Cada hoja fue etiquetada con números progresivos. Inmediatamente después se preparó un macerado de tejido infectado de ToBRFV en buffer de fosfatos pH 7.0, y el macerado se dividió en partes iguales para inocular *N. rustica* y *N. benthamiana*, respectivamente.

Desinfección de navajas e inoculación mecánica. Las áreas marcadas de las hojas a inocular se espolvorearon con carborundum 400 mallas y la navaja estéril se sumergió durante cinco segundos en el macerado de la fuente de inóculo o en macerado vegetal sano. Posteriormente, se sumergió la navaja de bisturí en un vaso de precipitado estéril con el tratamiento correspondiente (Cuadro 1) durante 30 segundos (inmersión) o se asperjó con ayuda de

Table 1. Treatments evaluated as disinfectants to avoid the mechanical spreading of the Tomato brown rugose fruit virus in *N. rustica* and *N. benthamiana* plants.
Cuadro 1. Tratamientos evaluados como desinfectantes para evitar la transmisión mecánica del Tomato brown rugose fruit virus en plantas de *N. rustica* y *N. benthamiana*.

| Tratamiento | Concentración (%) | Aplicación |
|--|------------------------------------|------------|
| Hipoclorito de sodio | 3 ^{a, b} | Aspersión |
| Hipoclorito de sodio | 3 ^{a, b} | Inmersión |
| Leche en polvo (Svelty®) | 6 ^{a, b} | Aspersión |
| Leche en polvo (Svelty®) | 6 ^{a, b} | Inmersión |
| Alcohol etílico | 70 ^a y 96 ^b | Aspersión |
| Alcohol etílico | 70 ^a y 96 ^b | Inmersión |
| Sales cuaternarias de amonio | 0.4 ^a y 2 ^b | Aspersión |
| Sales cuaternarias de amonio | 0.4 ^a y 2 ^b | Inmersión |
| Jabón líquido comercial | 18 ^a y 7.5 ^b | Inmersión |
| Jabón líquido comercial | 7.5 ^b | Aspersión |
| Hipoclorito de sodio y leche en polvo (Svelty®). | 3 y 6 ^{a, b} | Aspersión |
| Hipoclorito de sodio y leche en polvo (Svelty®). | 3 y 6 ^{a, b} | Inmersión |
| Agua destilada estéril (Testigo positivo) | No aplica | Aspersión |
| Agua destilada estéril (Testigo positivo) | No aplica | Inmersión |
| Agua destilada estéril (Testigo negativo) | No aplica | Aspersión |
| Agua destilada estéril (Testigo negativo) | No aplica | Inmersión |

^a= Concentration tested on *Nicotiana rustica*. / ^a= Concentración probada en *Nicotiana rustica*.

^b= Concentration tested on *N. benthamiana*. / ^b= Concentración probada en *N. benthamiana*.

be inoculated were dusted with carborundum 400 mesh and the sterile scalpel blade was submerged five seconds in the maceration of the inoculum source or in the healthy plant maceration. Later, this sterile blade was submerged in a sterile beaker with the corresponding treatment (Table 1) for 30 seconds (immersion) or it was sprayed on both sides of the blade (spraying), and immediately afterwards, the blade was rubbed on the surface of the rectangle drawn on the leaf. In the case of the leaves treated simultaneously with sodium hypochlorite and milk, they were first submerged or sprayed with sodium hypochlorite, followed immediately by milk. As a positive control, we used a blade that had only submerged in, or sprayed with, sterile distilled water after being submerged in the infectious macerated. As a negative control, the blade was submerged in the healthy plant macerate and then submerged in, or sprayed with, sterile distilled water. The inoculated leaves were rinsed with sterile water to remove the carborundum. For each treatment evaluated, different sterile blades were used.

Data evaluation and analysis. The local chlorotic lesions in the rectangle drawn on each leaf (local lesions/cm² =LL/cm²) were counted beginning five days after inoculation (dai) and up to 8 dai. The plants used for the treatments were kept in the greenhouse until they flowered to record the appearance of systemic symptoms. With the LL/cm², a non-parametric means comparison analysis was carried out with a Kruskal Wallis test; $\alpha \leq 0.05$ was considered for the statistical significance. The data were analyzed in the program JMP by SAS®.

The tomato plants used as the inoculant source amplified the expected fragment of 450 pb and its sequence had a similarity of 95% with *Tomato brown rugose fruit virus* isolate CA18-01 (Sequence ID: MT002973.1).

un atomizador por ambas caras de la navaja (aspersión), e inmediatamente después se frotó la superficie del rectángulo marcado en la hoja con la navaja. En el caso de las hojas tratadas simultáneamente con hipoclorito de sodio y leche, primero se sumergió o asperjó con hipoclorito de sodio e inmediatamente después con la leche. Como testigo positivo, se utilizó una navaja que se sumergió o asperjó solo con agua destilada estéril después de ser sumergida en el macerado infectivo. Como testigo negativo, la navaja fue sumergida en el macerado de una planta sana y posteriormente sumergida o asperjada con agua destilada estéril. Las hojas inoculadas se enjuagaron con agua estéril para eliminar el carborundum. Para cada tratamiento evaluado, se utilizaron diferentes navajas estériles.

Evaluación y análisis de datos. Las lesiones locales cloróticas en el rectángulo delimitado en cada hoja (lesiones locales/cm²=LC/cm²) se contabilizaron desde los cinco días después de la inoculación (ddi) y hasta los 8 ddi. Las plantas utilizadas para los tratamientos se mantuvieron en el invernadero hasta su floración para registrar la aparición de síntomas sistémicos. Con las LC/cm² se realizó un análisis no paramétrico de comparación de medias mediante una prueba de Kruskal Wallis, se consideró un $\alpha \leq 0.05$ para la significancia estadística. Los datos fueron analizados en el programa de JMP de SAS®.

Las plantas de jitomate utilizadas como fuente de inóculo amplificaron el fragmento esperado de 450 pb y su secuencia tuvo una similitud del 95% con *Tomato brown rugose fruit virus* isolate CA18-01 (Sequence ID: MT002973.1).

Bioensayos. Para *N. rustica*, la prueba de Kruskal Wallis mostró diferencia significativa entre los tratamientos ($J_i < 0.0001$). Los mejores fueron el hipoclorito de sodio al 3% seguido de la leche en

Bioassays. For *N. rustica*, the Kruskal Wallis test displayed a significant difference between treatments ($J_i < .0001$). The best was sodium hypochlorite at 3%, followed by powdered milk, both by immersion and sprayed. These two treatments behaved in the same way as the negative control (Table 2). The treatment with the greatest number of LL/cm² was ethyl alcohol at 70% by immersion, with values higher than those of the positive control (Table 2). The sodium hypochlorite and powdered milk, applied individually, reduced by 99 and 96% the number of local lesions, respectively, in relation to the positive control; meanwhile, the liquid soap by immersion and ethyl alcohol at 70% as a spray reduced the appearance

polvo tanto en inmersión como asperjado. Estos dos tratamientos se comportaron igual al testigo negativo (Cuadro 2). El tratamiento con el mayor número de LC/cm² fue el alcohol etílico al 70% en inmersión, con valores superiores a los del testigo positivo (Cuadro 2). El hipoclorito de sodio y la leche en polvo, aplicados de manera individual, tuvieron una reducción del 99 al 96% del número de lesiones locales, respectivamente, con relación al testigo positivo; mientras que el jabón líquido en inmersión y el alcohol etílico al 70% en aspersión, redujeron la aparición de lesiones locales en 85 y 83%, respectivamente. En el caso de las sales cuaternarias de amonio se tuvo una reducción en el número de lesiones locales del 30%.

Table 2. Means and standard deviation of the number of local lesions/cm² obtained on leaves of *Nicotiana rustica* and *N. benthamiana* from every disinfectant evaluated.

Cuadro 2. Medias y desviación estándar del número de lesiones locales/cm² obtenidas en hojas de *Nicotiana rustica* y *N. benthamiana* de cada desinfectante evaluado.

| Tratamiento | Concentración (%) | Aplicación | <i>Nicotiana rustica</i> | | <i>Nicotiana benthamiana</i> | |
|---------------------------------------|------------------------------------|------------|--------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
| | | | Media | Desviación estándar | Media | Desviación estándar |
| Agua - Testigo negativo | No aplica | Aspersión | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Agua - Testigo negativo | No aplica | Inmersión | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hipoclorito de sodio y leche en polvo | 3 y 6 ^{y,z} | Aspersión | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hipoclorito de sodio y leche en polvo | 3 y 6 ^{y,z} | Inmersión | 0 | 0 | 0.04 | 0.05 |
| Leche en polvo | 6 ^{y,z} | Inmersión | 0.05 | 0.06 | 0.7 | 1.18 |
| Hipoclorito de sodio | 3 ^{y,z} | Inmersión | 0.27 | 0.31 | 0.32 | 0.66 |
| Hipoclorito de sodio | 3 ^{y,z} | Aspersión | 0.32 | 0.32 | 0.06 | 0.09 |
| Leche en Polvo | 6 ^{y,z} | Aspersión | 0.38 | 0.3 | 0 | 0 |
| Jabón líquido comercial | 18 ^y y 7.5 ^z | Inmersión | 0.73 | 0.63 | 0.48 | 0.32 |
| Jabón líquido comercial | 7.5 ^z | Aspersión | -- | -- | 0.14 | 0.22 |
| Alcohol etílico | 70 ^y y 96 ^z | Aspersión | 0.79 | 0.4 | 2.04 | 1.52 |
| Sales cuaternarias de amonio | 0.4 ^y y 2 ^z | Aspersión | 2.49 | 2 | 0 | 0 |
| Sales cuaternarias de amonio | 0.4 ^y y 2 ^z | Inmersión | 3.22 | 2.16 | 0.16 | 0.19 |
| Agua - Testigo positivo | No aplica | Inmersión | 3.44 | 1.89 | 1.7 | 1.45 |
| Agua - Testigo positivo | No aplica | Aspersión | 4.78 | 1.46 | 9.64 | 3.16 |
| Alcohol etílico | 70 ^y y 96 ^z | Inmersión | 12.03 | 11.66 | 1.42 | 0.88 |

^y= Concentración probada en *Nicotiana rustica*. / ^z= Concentración probada en *Nicotiana rustica*.

^y= Concentración probada en *N. benthamiana*. / ^z= Concentración probada en *N. benthamiana*.

of local lesions by 85 and 83%, respectively. In the case of the quaternary ammonium salts, there was a reduction of 30% in the number of local lesions.

For *N. benthamiana*, the Kruskal Wallis test displayed significant differences between treatments ($J_i < .0001$). The 3% sodium hypochlorite followed by the powdered milk, the powdered milk and the quaternary ammonium salts, applied by spraying, were the treatments with the least local lesions that behaved in the same way as the negative control. The contrary was true for the ethyl alcohol at 96%, which had the highest number of local lesions, yet below the positive control (Table 2).

The 3% sodium hypochlorite, applied by spraying, reduced the LL/cm² by 99%, whereas its application by immersion reduced them by 94%, in comparison with the average of the positive control. The commercial liquid soap, applied by spraying and immersion, reduced the number of LL/cm² by 91 and 97%, respectively. The powdered milk, applied by immersion, reduced the appearance of LL/cm² by 87%. In general terms, the treatments applied by spraying appeared to be more effective than by immersion. Probably, the effect of the pressure with which the treatment is fired from the container favors the “cleanliness” of the blade and more viral particles are eliminated.

In *N. benthamiana* and *N. rustica*, the local chlorotic lesions appeared 4 to 6 days after inoculation. Later, the chlorotic lesions turned necrotic and coalesced (Figures 1 and 2). The appearance of systemic symptoms (severe chlorosis and mosaic) was recorded at 15 dai in treatments in which the number of LL/cm² was higher and in the treated plants with less LL/cm² the appearance of symptoms was recorded at 20 to 23 dai. Only in treatments with 0 LL/cm², including the negative controls, no systemic symptoms were observed.

The dose of quaternary ammonium salts applied on the treatments in this investigation surpass

Para *N. benthamiana*, la prueba de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($J_i < .0001$). El hipoclorito de sodio al 3% seguido de la leche en polvo, la leche en polvo y las sales cuaternarias de amonio, aplicados por aspersión, fueron los tratamientos con menos lesiones locales que se comportaron igual que el testigo negativo. Caso contrario, el alcohol etílico al 96% tuvo el mayor número de lesiones locales, pero por debajo del testigo positivo (Cuadro 2).

El hipoclorito de sodio al 3% aplicado por aspersión redujo en un 99% las LC/cm², mientras que su aplicación en inmersión redujo el 94%, comparado con el promedio del testigo positivo. El jabón líquido comercial aplicado por aspersión e inmersión redujo en 91 y 97%, respectivamente, el número de LC/cm². La leche en polvo aplicada por inmersión redujo en 87% la aparición de LC/cm². De manera general, se observó que la aplicación por aspersión fue más efectiva que por inmersión. Probablemente el efecto que tiene la presión con la que sale disparado el tratamiento del propio aspersor, favorezca la “limpieza” de la navaja y se eliminen más partículas virales.

En *N. benthamiana* y *N. rustica* las lesiones locales cloróticas aparecieron entre los cuatro y seis días después de la inoculación. Posteriormente, las lesiones cloróticas se necrosaron y coalescieron (Figura 1 y 2). La aparición de síntomas sistémicos (clorosis severa y mosaico) se registró a los 15 ddi en los tratamientos cuyo número de LC/cm² fue mayor y en las plantas tratadas que tuvieron menos LC/cm² se registró la aparición de síntomas entre los 20 y 23 ddi. Solamente en los tratamientos que tuvieron 0 LC/cm², incluyendo los testigos negativos, no se observaron síntomas sistémicos.

Las dosis de las sales cuaternarias de amonio aplicadas en los tratamientos de la presente investigación exceden la recomendada por el fabricante como “viricida” (0.5 L/400 L de agua =0.125%);

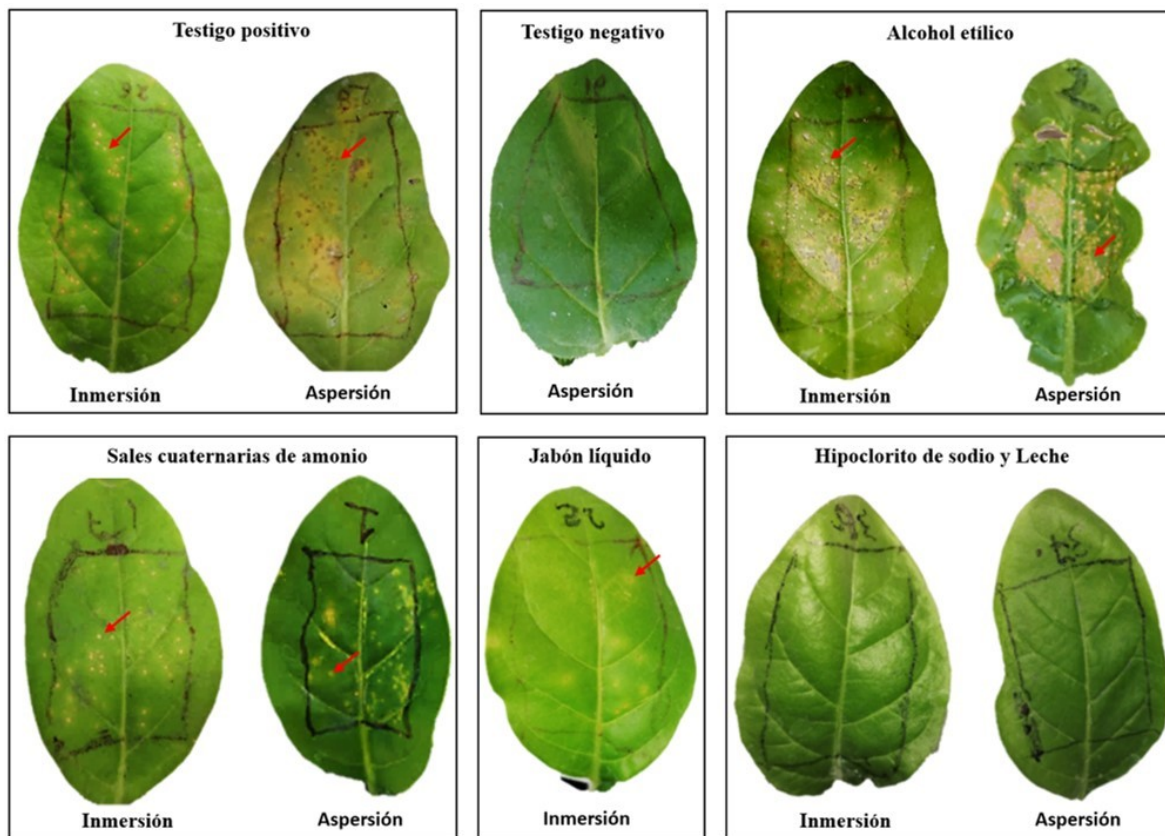


Figure 1. Local chlorotic and necrotic lesions on *Nicotiana rustica* leaves (arrows) caused by ToBRFV after 13 days post inoculation with blades treated with different disinfectants.

Figura 1. Lesiones locales cloróticas y necróticas en hojas de *Nicotiana rustica* (flechas) ocasionadas por ToBRFV después de 13 días de la inoculación con navajas tratadas con diferentes desinfectantes.

the dose recommended by the manufacturer as “viricidal” (0.5 L/400 L water =0.125%), although it did not avoid the appearance of local lesions or systemic symptoms. Despite the range of action of the quaternary ammonium compounds being wide and presenting disinfectant activity over bacteria and fungi, it is well-known to work better on viruses with a lipid cover (Diomedi *et al.*, 2017). Both the quaternary ammonium salts and ethyl alcohol are widely recommended to eliminate viruses. However, in this study and in the one carried out by Chanda and collaborators (2021), the

sin embargo, no logró evitar la aparición de lesiones locales ni de síntomas sistémicos. Si bien el espectro de acción de los compuestos de amonio cuaternario es muy amplio presentando actividad desinfectante sobre bacterias y hongos, se sabe que funciona mejor en virus envueltos en una capa lipídica (Diomedi *et al.*, 2017). Tanto las sales cuaternarias de amonio como el alcohol etílico son ampliamente recomendados para eliminar virus; sin embargo, en este estudio y en el realizado por Chanda y colaboradores (2021), los tratamientos con sales cuaternarias y alcohol no fueron efectivos

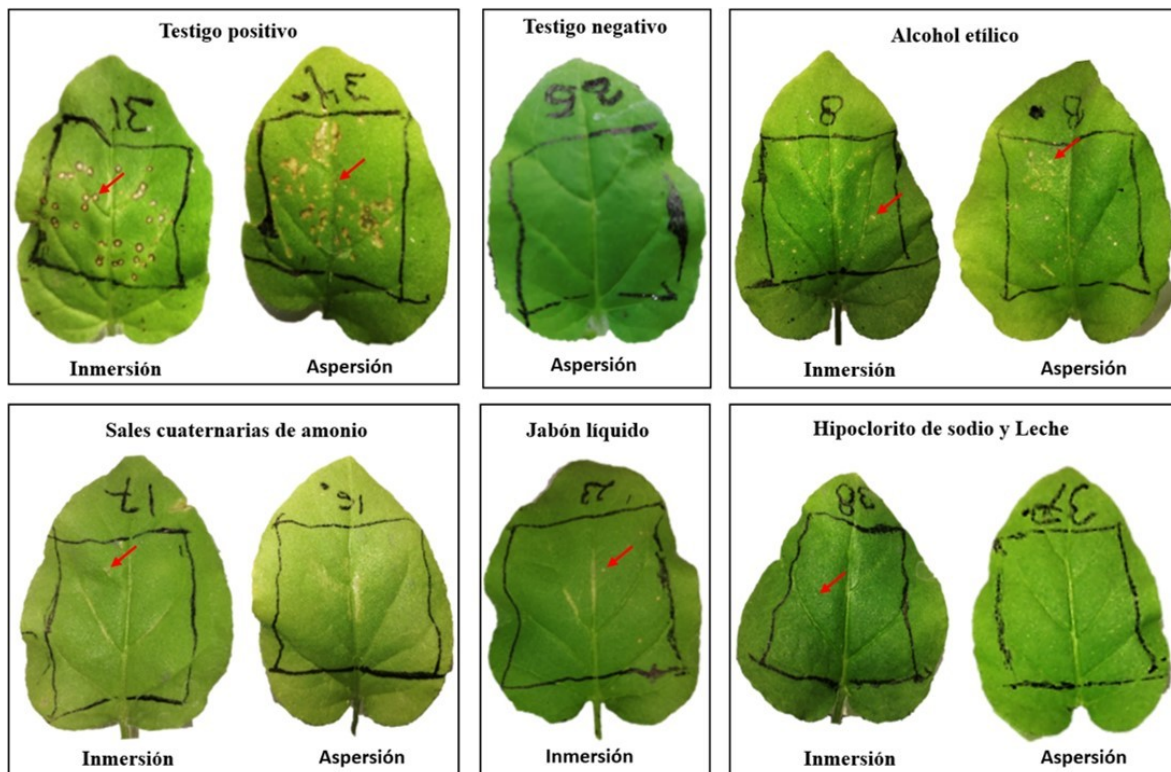


Figure 2. Local chlorotic and necrotic lesions on *Nicotiana benthamiana* leaves (arrows) caused by ToBRFV after 12 days pots inoculation with blades treated with different disinfectants.
 Figura 2. Lesiones locales cloróticas y necróticas en hojas de *Nicotiana benthamiana* (flechas) ocasionadas por ToBRFV después de 12 días de la inoculación con navajas tratadas con diferentes desinfectantes.

treatments with quaternary salts and alcohol were not effective to avoid the spreading of the ToBRFV, probably due to the nature of the protein cover of the tobamovirus that do not have a lipid layer (Luria *et al.*, 2017).

Regarding the soap, the effect of detergents on the stability of viruses has been documented and it is known that it depends widely on their pH (Ward and Ashley, 1979) and on the conformation of the cover of the capsid. In viruses with a lipid cover, such as SARS-CoV-2, the use of soaps has been widely recommended (Welch *et al.*, 2020). The ToBRFV lacks a lipid membrane, and although the soap reduced the number of lesions, it did not avoid the appearance of systemic symptoms.

para evitar la transmisión del ToBRFV, probablemente debido a la naturaleza de la cubierta proteica de los tobamovirus que carece de capa lipídica (Luria *et al.*, 2017).

Respecto al jabón, se ha documentado el efecto de detergentes en la estabilidad de los virus, y se sabe que depende ampliamente de su pH (Ward y Ashley, 1979) y de la conformación de la cubierta de la cápside. En virus con cubierta lipídica, como el SARS-CoV-2, el uso de jabones ha sido ampliamente recomendado (Welch *et al.*, 2020). El ToBRFV carece de membrana lipídica, y aunque el jabón redujo el número de lesiones no evitó la aparición de síntomas sistémicos.

The 3% sodium hypochlorite is effective to avoid the spreading of viruses and does not produce phytotoxicity (Chanda *et al.*, 2021). Chlorine is one of the disinfectants with intermediate efficiency, since it disactivates drastically in the presence of organic matter (Vignoli, 2006). For this reason, as an independent treatment, it is not as effective when applied by immersion with the tool due to organic matter accumulating in the container and despite having displayed good results when applied by spraying, it did not stop systemic symptoms from appearing.

Lactoferrin was recently proven to be effective in avoiding infections by ToBRFV and the *Cucumber green mottle mosaic virus*, since this glycoprotein probably joins the cell receptor used by the virus (Chanda *et al.*, 2021). It is possible that the proteins in the milk used in this investigation may have a similar function to lactoferrin, lysozyme and lactoperoxidase, among others (Rodríguez *et al.*, 2005) and may, therefore, join the cell receptors of the viral particle, stopping it from attaching to the host cell and unleashing the cell infection process. On the other hand, applying reconstituted fat-free milk can be very effective to reduce the activity of the *Tobacco mosaic virus* on the surfaces of plants, tools and clothing (Chase, 2014). Submerging tools in milk has proven ineffective, therefore they must be sprayed, and sometimes, the treatment may work up to 10 days after applying, so long as they have not been washed (Chase, 2014). However, the problem with applying them directly on plants is that it may promote the development of sooty mold. In addition, there are no guidelines that allow or prohibit the use of milk to control viruses (Chase, 2014).

Under the conditions in which this investigation was carried out, the treatment that avoided the appearance of systemic symptoms in both species of *Nicotiana* was the combination of 3% sodium

En el caso del hipoclorito de sodio al 3% es efectivo para evitar la transmisión de virus y no genera fitotoxicidad (Chanda *et al.*, 2021). El cloro es uno de los desinfectantes de eficiencia intermedia ya que se inactiva drásticamente ante la presencia de materia orgánica (Vignoli, 2006). Por esta razón como tratamiento independiente, no es tan efectivo aplicado por inmersión de la herramienta debido a la acumulación de materia orgánica que se va generando en el recipiente y, si bien, aplicado por aspersión mostró buenos resultados, no impidió la aparición de síntomas sistémicos.

Recientemente se demostró que la lactoferrina fue efectiva para evitar la infección de ToBRFV y del *Cucumber green mottle mosaic virus*, ya que probablemente esta glicoproteína se una al receptor celular que utiliza el virus (Chanda *et al.*, 2021). Es posible que las proteínas de la leche utilizadas en este trabajo tengan una función similar a la lactoferrina, la lisozima y la lactoperoxidasa, entre otras (Rodríguez *et al.*, 2005) y, por tanto, se unan a los receptores celulares de la partícula viral, impidiendo que se adhiera a la célula hospedante y se desencadene el proceso de infección celular. Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación de la leche sin grasa reconstituida puede ser muy efectiva para reducir la actividad del *Tobacco mosaic virus* sobre superficies vegetales, herramientas y ropa (Chase, 2014). Se ha visto que sumergir las herramientas en la leche no es efectivo, por lo cual debe asperjarse y que, en algunas ocasiones, el tratamiento puede funcionar hasta 10 días después de su aplicación, siempre y cuando no haya lavado (Chase, 2014). Sin embargo, el inconveniente de aplicarla directamente sobre las plantas es que puede favorecer el desarrollo de fumagina; además no existe algún lineamiento que permita o no el uso de leche para controlar virus (Chase, 2014).

Bajo las condiciones realizadas en esta investigación, el tratamiento que evitó la aparición de

hypochlorite and the latter addition of 6% milk (Svelty®), each in individual containers and sprayed on both sides of the blade in the order mentioned here. It is important to keep the sodium hypochlorite and milk in separate containers and apply the sodium hypochlorite before the milk, since the milk could deactivate the effect of the sodium hypochlorite. It is necessary to study whether 3% sodium hypochlorite acts first on the virions and then the proteins in the milk inactivate the remaining infectious viral particles. It is also important to verify if 3% sodium hypochlorite and 6% milk have the same effectiveness on the cutting tools used on chili pepper or tomato crops.

In conclusion, although most disinfectants reduced local lesions significantly, only spraying 3% sodium hypochlorite, followed by 6% powdered milk on the blade avoided the mechanical transmission of the *Tomato brown rugose fruit virus* in *N. benthamiana* and *N. rustica*.

LITERATURE CITED

- Alkowni R, Alabdallah O and Fadda Z. 2019. Molecular identification of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology* 101: 719–723. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Rangel SA, García-Ávila DJC and López-Buenfil JA. 2018. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1): 185–192. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-5>
- Chanda B, Shamimuzzaman Md, Gilliard A and Ling K-S. 2021. Effectiveness of disinfectants against the spread of tobamoviruses: *Tomato brown rugose fruit virus* and *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Virology Journal* 18: 7. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01479-8>
- Chase AR. 2014. The Truth About Milk and TMV. Chase Agricultural Consulting LLC. Greenhouse Product News. <https://gpnmag.com/article/truth-about-milk-and-tmv/> (Consultada, julio 2021)
- Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao MI, Medel M, Quintanilla M, Riedel G, Tinoco J y Cifuentes M. 2017. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista chilena de infectología* 34: 156-174. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) 2019a. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in Greece. Reporting Service 2019/210. <https://gd.eppo.int/reporting/article-6640> (Consultada, febrero 2021)
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) 2019b. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in Spain. Reporting Service. 2238. <https://gd.eppo.int/reporting/article-6668> (Consultada, febrero 2021)
- Fidan H, Sarikaya P and Calis O. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* on tomato in Turkey. *New Disease Reports* 39: 18. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018>

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



- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2021. FAOSTAT. Crops and livestock products. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. (Consultada, agosto 2021).
- Foolad MR and Panthee DR. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 93-123. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2011.616057>
- Jordon-Thaden IE, Chanderbali AS, Gitzendanner MA and Soltis DE. 2015. Modified CTAB and TRIZOL protocols improve RNA extraction from chemically complex Embryophyta. *Applied Plant Sciences* 3(5): apps.1400105. <https://doi.org/10.3732/apps.1400105>.
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, Sela N, Laskar O, Milrot E and Dombrovsky A. 2019. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of *Tomato brown rugose fruit virus* contributing to disease spread in tomatoes. *PLoS ONE* 14(1): e0210871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>
- Ling KS, Tian T, Gurung S, Salati R and Gilliard A. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting greenhouse tomato in the United States. *Plant Disease* 103: 1439. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I and Dombrovsky A. 2017. A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PloS ONE* 12(1): e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>.
- Ministère de L'Agriculture et de L'Alimentation (MAA). 2020. Virus ToBRFV: le ministère confirme la contamination de tomates en serre dans le Finistère. <https://agriculture.gouv.fr/virus-tobrfv-le-ministere-confirme-la-contamination-de-tomates-en-serre-dans-le-finistere> (Consultada, febrero 2021)
- Menzel W, Knierim D, Winter S, Hamacher J and Heupel M. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting tomato in Germany. *New Disease Report* 39:1. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>
- Panno S, Caruso AG and Davino S. 2019. First Report of *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease* 103: 1443. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Panno S, Caruso AG, Blanco G and Davino S. 2020a. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting sweet pepper in Italy. *New Disease Report* 41: 20. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.020>
- Panno S, Caruso AG, Stefano B, Lo Bosco G, Ezequiel RA and Salvatore D. 2020b. Spread of *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* in Sicily and Evaluation of the Spatiotemporal Dispersion in Experimental Conditions. *Agronomy* 10: 834. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060834>
- Rodríguez FDA, Vázquez ML y Ramos CMG. 2005. Actividad antimicrobiana de la Lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47: 102-11. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=5166>
- Salem NM, Cao MJ, Odeh S, Turina M and Tahzima R. 2020. First Report of *Tobacco mild green mosaic virus* and *Tomato brown rugose fruit virus* Infecting *Capsicum annum* in Jordan. *Plant Disease* 104 (2). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1189-PDN>
- Salem NM, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW and Turina M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology* 161: 503-506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Salvatore D, Caruso AG, Bertacca S, Barone S and Panno S. 2020. *Tomato Brown Rugose Fruit Virus*: Seed Transmission Rate and Efficacy of Different Seed Disinfection Treatments. *Plants* 9: 1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>
- Skelton A, Buxton-Kirk A, Ward R, Harju V, Frew L, Fowkes A, Long M, Negus A, Forde S, Adams IP, Pufal H, McGreig S, Weekes R and Fox A. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in the United Kingdom. *New Disease Report* 40: 12. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.040.012>
- Vignoli R. 2006. Esterilización y desinfección. Temas de Bacteriología y Virología para CEFA. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Instituto de Higiene. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap> (Consultada, mayo 2021).
- Ward RL and Ashley CS. 1979. pH modification of the effects of detergents on the stability of enteric viruses. *Applied Environmental Microbiology* 38: 314-322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243483/pdf/aem00201-0140.pdf>
- Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG and Killip MJ. 2020. Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. *Journal of Clinical Microbiology* 58: e01713-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01713-20>
- Yan ZY, Ma HY, Han SL, Geng C, Tian YP and Li XD. 2019. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* infecting tomato in China. *Plant Disease* 103: 2973. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>

# ***In vitro* nematocidal activity of the *Pleurotus djamor* PdR-2 fraction against J2 of *Meloidogyne enterolobii***

## **Actividad nematocida *in vitro* de la fracción PdR-2 de *Pleurotus djamor* contra J2 *Meloidogyne enterolobii***

**Olga Gómez-Rodríguez**, Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Texcoco, Estado de México, México; **Jesús Antonio Pineda-Alegría**, <sup>1</sup>Unidad de Helminología, CENID-Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla. No. 8534, C. P. 62550, Jiutepec, Morelos, México; **<sup>1</sup>Gloría Sarahi Castañeda-Ramírez; Manasés González-Cortazar**, Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social. Argentina No. 1. Col. Centro. C.P. 62790, Xochitepec, Morelos, México; **José E. Sánchez**, El Colegio de la Frontera Sur, carretera al Antiguo Aeropuerto km. 2.5 C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, México; **<sup>1</sup>Liliana Aguilar-Marcelino\***.

\*Corresponding author: [aguilar.liliana@inifap.gob.mx](mailto:aguilar.liliana@inifap.gob.mx)

Received: February 10, 2022.

Accepted: April 15, 2022.

Gómez-Rodríguez O, Pineda-Alegría JA, Castañeda-Ramírez GS, González-Cortazar M, Sánchez JE and Aguilar-Marcelino L. 2022. *In vitro* nematocidal activity of the *Pleurotus djamor* PdR-2 fraction against J2 of *Meloidogyne enterolobii*. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 254-262.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-2>

Primera publicación DOI: 26 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 26, 2022.

**Abstract.** Recently, the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* have generated important economic losses (65%) in worldwide agriculture. In the present study, the nematocidal activity of the PdR-2 fraction of *Pleurotus djamor* was evaluated against the second instar juvenile (J2) of *M. enterolobii*. Different concentrations of the PdR-2 fraction (0.039, 0.078, 0.156, 0.132, 0.625, and 1.25 mg mL<sup>-1</sup>) were evaluated, as well as the respective control groups (water and Levamisole,

**Resumen.** Recientemente, el nematodo agallador *Meloidogyne enterolobii* ha generado importantes pérdidas económicas (65%) en la agricultura a nivel mundial. En el presente estudio se evaluó la actividad nematocida de la fracción PdR-2 de *Pleurotus djamor* contra juveniles del segundo estadio (J2) de *M. enterolobii*. Se evaluaron diferentes concentraciones de la fracción PdR-2 (0.039, 0.078, 0.156, 0.132, 0.625 y 1.25 mg mL<sup>-1</sup>), así como los respectivos grupos de control (agua y Levamisol, 5 mg mL<sup>-1</sup>) en un volumen de 100 µL (n=4). Los J2 fueron expuestos durante 24 h y posteriormente cuantificados, y se estimó el porcentaje de mortalidad. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y una comparación de medias con la prueba de Tukey (p<0,05). La fracción PdR-2 a concentraciones de 0.132, 0.625 y 1.25 mg mL<sup>-1</sup> fue significativamente igual con respecto a la aplicación de Levamisol, con una mortalidad de 87.6, 84.5 y 86.3%, respectivamente. En la concentración más baja (0.039 mg mL<sup>-1</sup>) se registró una mortalidad del 40.3%, mientras que en la concentración

5 mg mL<sup>-1</sup>) in a volume of 100 µL (n=4). J2s were exposed for 24 h and subsequently quantified, and the percentage of mortality was estimated. Data were analyzed by analysis of variance with the general linear model and a comparison of means with Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The PdR-2 fraction at concentrations of 0.132, 0.625, and 1.25 mg mL<sup>-1</sup> were significantly equal with respect to Levamisole application, showing a mortality of 87.6, 84.5, and 86.3%, respectively. At the lowest concentration (0.039 mg mL<sup>-1</sup>), 40.3% mortality was recorded, whereas 86% was recorded at the highest concentration evaluated (1.25 mg mL<sup>-1</sup>). The PdR-2 fraction of *P. djamor* had nematocidal activity against J2s of *M. enterolobii*.

**Key words:** root-knot nematode, Edible mushroom, Chemical fraction, Alternative control

Plant-parasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* cause significant economic losses worldwide (Abd-Elgawad and Askary, 2015). One hundred species of the genus *Meloidogyne* that parasitize vascular plants have been described (Moens *et al.*, 2009). *M. incognita* is one of the most widely distributed species, followed by *M. javanica*, *M. arenaria*, and *M. hapla* (Carrillo-Fasio *et al.*, 2019).

However, *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) has become one of the most important species worldwide in recent decades because of its high aggressiveness (Castagnone-Sereno, 2012), its reproductive potential, wide geographic distribution, large host range, including both herbaceous and woody plants, and its ability to establish on plants carrying resistance genes to other *Meloidogyne* spp., such as some genotypes of tomato (*Mi-1*), potato (*Mh*), soybean (*Mir1*), and chili bell pepper (*N* and *Tabasco*) (Castagnone-Sereno, 2012). *M. enterolobii* has been reported

más alta (1.25 mg mL<sup>-1</sup>) se registró un 86%. La fracción PdR-2 de *P. djamor* tuvo actividad nematocida contra los J2 de *M. enterolobii*.

**Palabras clave:** Nematodo agallador, hongo comestible, fracción química, alternativa de control

Los nemátodos del género *Meloidogyne*, parásitos de plantas, causan pérdidas económicas significativas a nivel mundial (Abd-Elgawad y Askary, 2015). Se han descrito cien especies del género *Meloidogyne* que parasitan plantas vasculares (Moens *et al.*, 2009). *M. incognita* es una de las especies con la más amplia distribución, seguida de *M. javanica*, *M. arenaria*, y *M. hapla* (Carrillo-Fasio *et al.*, 2019).

Sin embargo, *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) se ha vuelto una de las especies más importantes del mundo en las últimas décadas debido a su gran agresividad (Castagnone-Sereno, 2012), su potencial reproductivo, su amplia distribución geográfica, su gran rango de hospedantes que incluye tanto a plantas herbáceas como leñosas, y su habilidad de establecerse en plantas con genes de resistencia a otras especies de *Meloidogyne* spp., como algunos genotipos del tomate (*Mi-1*), papa (*Mh*), soya (*Mir1*) y pimiento morrón (*N* and *Tabasco*) (Castagnone-Sereno, 2012). *M. enterolobii* ha sido reportado en África, Europa, Estados Unidos, Centroamérica y Sudamérica (Castagnone-Sereno, 2012; Moens *et al.*, 2009). Recientemente, en México, se reportó parasitando sandía (*Citrullus lanatus*) en Veracruz y chile (*Capsicum annuum*) en Sinaloa (Ramirez-Suarez *et al.*, 2014; Villar-Luna *et al.*, 2016). En los estados de Sinaloa y Baja California Sur, *M. enterolobii* prevalece sobre *M. incognita* (Carrillo-Fasio *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2019).

El manejo de *Meloidogyne* spp. se ha enfocado, sobre todo, en el control químico, la biofumigación

in Africa, Europe, the United States of America, Central America, and South America (Castagnone-Sereno, 2012; Moens *et al.*, 2009). Recently, in Mexico, it was reported parasitizing watermelon (*Citrullus lanatus*) in the state of Veracruz and chilli (*Capsicum annuum*) in Sinaloa (Ramirez-Suarez *et al.*, 2014; Villar-Luna *et al.*, 2016). In the states of Sinaloa and Baja California Sur, *M. enterolobii* is more prevalent than *M. incognita* (Carrillo-Fasio *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2019).

Management of *Meloidogyne* spp. has focused mainly on chemical control, soil biofumigation, amendments, and resistant varieties (Cid del Prado-Vera *et al.*, 2018). However, these control methods have not been sufficient for *M. enterolobii* given the intrinsic characteristics of its biology. Therefore, it is important to continue searching for other management alternatives for this nematode species. One of the alternatives is the use of nematocidal compounds found in the environment (Akhtar and Malik, 2000). On the other hand, one of the sustainable alternatives is the use of endophytic bacteria such as *Serratia ureilytica*, which has been evaluated *in vitro* against *Nacobbus aberrans* (J2) and in infected chilli plants, obtaining encouraging results (Wong *et al.*, 2021).

These types of compounds with nematocidal activity have been reported in mushrooms of the genus *Pleurotus* (Barron and Thorn, 1987), in addition to having the ability to colonize and degrade a great variety of lignocellulosic residues and high medicinal and nutritional value (Cohen *et al.*, 2002). A toxin was identified in this genus of fungi as trans-2-decenedioic acid, with a nematocidal effect against *Panagrellus redivivus* (Kwok *et al.*, 1992). There have also been studies with activity against phytoparasites (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020). Furthermore, Heydari *et al.* (2006) reported the presence of a toxin in five *Pleurotus* spp. in water agar with an effect against *M. javanica* (J2).

del suelo, enmiendas y variedades resistentes (Cid del Prado-Vera *et al.*, 2018). Sin embargo, estos métodos de control no han sido suficientes para *M. enterolobii*, dadas las características intrínsecas de su biología. Por lo tanto, es importante seguir buscando otras alternativas de manejo para esta especie de nematodo. Una de las alternativas es el uso de compuestos nematocidas que se encuentran en el ambiente (Akhtar y Malik, 2000). Por otra parte, una de las alternativas sustentables es el uso de bacterias endófitas tales como *Serratia ureilytica*, que ha sido evaluada *in vitro* contra *Nacobbus aberrans* (J2) y en plantas de chile infectadas, con resultados alentadores (Wong *et al.*, 2021).

Estos tipos de compuestos con actividad nematocida se han reportado en hongos del género *Pleurotus* (Barron y Thorn, 1987), además de tener la habilidad de colonizar y degradar una gran variedad de residuos lignocelulósicos y altos valores medicinales y nutritivos (Cohen *et al.*, 2002). Una toxina fue identificada en este género de hongos como ácido trans-2-decenedioico, con efectos nematocidas contra *Panagrellus redivivus* (Kwok *et al.*, 1992). También existen estudios con actividad contra fitoparásitos (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020). Además, Heydari *et al.* (2006) reportaron la presencia de una toxina en cinco especies de *Pleurotus* spp. con un efecto contra *M. javanica* (J2) en agua agar. Asimismo, la actividad proteolítica de *P. ostreatus* ha sido reportada en el nematodo de vida libre *Panagrellus* sp. (Genier *et al.*, 2015).

Además, se le ha atribuido propiedades anti-parasíticas, principalmente cestocidas (Samsam-Shariat *et al.*, 1994) y nematocidas en el área del ganado (Pineda-Alegría *et al.*, 2017). Sin embargo, en el área agrícola es importante realizar estudios que contribuyan al desarrollo de bionemáticas naturales con base en hongos comestibles. La fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* ha sido reportado con actividad nematocida en larvas infecciosas

Likewise, the proteolytic activity of *P. ostreatus* is reported on the free-living nematode *Panagrellus* sp. (Genier *et al.*, 2015).

Additionally, it has been attributed to antiparasitic properties, mainly cestocidal (Samsam-Shariat *et al.*, 1994) and nematocidal in the livestock area (Pineda-Alegría *et al.*, 2017); however, in the agricultural area, it is important to conduct studies that contribute to the development of natural bionematicides based on edible fungi. The PdR-2 fraction of the edible mushroom *P. djamor* has been previously reported with nematocidal activity on infective larvae (L3) of *Haemonchus contortus* *in vitro* studies (González-Cortazar *et al.*, 2020). For this reason, the nematocidal activity of the PdR-2 fraction of *P. djamor* against J2s of *M. enterolobii* was evaluated in the present study.

The present study was carried out at the Helminthology Laboratory of the National Center for Disciplinary Research in Animal Health and Safety (CENID-SAI) of the National Institute of Forestry, Agriculture, and Livestock Research (INIFAP), located in Jiutepec, Morelos, Mexico. J2 were obtained from the root-knot of tomato cv. 'Rio Grande' (monoxenic crop, population of Ahome, Sinaloa) at the Postgraduate College, Montecillo Campus, Texcoco. Eggs were extracted according to the methodology of Vrain (1977) and incubated at 28±1 °C in Petri dishes with sterile distilled water to obtain J2.

#### **Obtaining the PdR-2 fraction of *P. djamor*.**

The PdR-2 fraction was obtained from the hydroalcoholic extract (ethanol-water 7:3) of *P. djamor* strain ECS-0127 basidiomata. The extract (30 g) was adsorbed on 40 g of normal phase silica gel (70-230 mesh, Merck) and placed on a pre-packed glass chromatographic column. The elution system was performed with dichloromethane:methanol with the following system changes: 100, 90:10, 70:30, 50:50, and

(L3) en estudios *in vitro* de *Haemonchus contortus* (González-Cortazar *et al.*, 2020). Por este motivo, el presente estudio evaluó la actividad nematocida de la fracción PdR-2 de *P. djamor* contra J2s de *M. enterolobii*.

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Helminthología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Jiutepec, Morelos, México. Se obtuvieron los J2 de las agallas del tomate cv. 'Rio Grande' (cultivo monoxeno, población de Ahome, Sinaloa) en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco. Se extrajeron huevos siguiendo la metodología de Vrain (1977) y se incubaron a 28±1 °C en cajas Petri con agua estéril destilada para obtener los J2.

**Obtención de la fracción PdR-2 de *P. djamor*.** Se obtuvo la fracción PdR-2 del extracto hidroalcohólico (etanol-agua 7:3) de *P. djamor* cepa ECS-0127 basidiomata. El extracto (30 g) fue adsorbido en 40 g de gel de silicio en fase normal (malla 70-230, Merck) y colocado en una columna cromatográfica de vidrio pre-ensugada. El sistema de elución se llevó a cabo con diclorometano:metanol con los siguientes cambios al sistema: 100, 90:10, 70:30, 50:50 y 100%. Se recolectaron muestras que fueron concentradas en un rotavapor. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina y se juntaron de acuerdo a su factor de retención y sistema de elución. De este fraccionamiento se obtuvieron 22 fracciones, de las que las fracciones 11 a 18 formaron la fracción PdR-2 (González-Cortazar *et al.*, 2020).

**Evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 de *P. djamor* contra J2 de *M. enterolobii*.** Diferentes concentraciones de la fracción PdR-2 y 100 especímenes J2 de *M. enterolobii* se colocaron en una

100%. Samples were collected and concentrated in a rotary evaporator. The fractions were analyzed by thin layer chromatography and pooled according to their retention factor and elution system. From this fractionation, 22 fractions were obtained, of which fractions 11 to 18 formed the PdR-2 fraction (González-Cortazar *et al.*, 2020).

***In vitro* evaluation of the PdR-2 fraction of *P. djamora* against J2 of *M. enterolobii*.** Different concentrations of the PdR-2 fraction and 100 J2 specimens of *M. enterolobii* were placed in a 96-well plate. The final concentrations of the fraction were 0.039, 0.078, 0.156, 0.132, 0.625, and 1.25 mg mL<sup>-1</sup> and controls, which were distilled water and Levamisole (commercial anthelmintic) 5 mg mL<sup>-1</sup> in a volume of 100 µL (n=4). The J2 were exposed for 24 h, and after the exposure time, 10 aliquots of 10 µL were taken from each repetition, and the number of dead and alive individuals were counted. The number of dead individuals was used to calculate the percentage of mortality using the following formula:

$$\text{larval mortality} = \frac{\text{dead nematodes}}{\text{dead nematodes} + \text{live nematodes}} \times 100$$

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) with the general linear model and a comparison of means with Tukey's test (\*p ≤ 0.05). STATGRAPHICS Centurion XV, V. 15.2.06 software was used for statistical procedures.

The mortality of *M. enterolobii* J2 is presented in Table 1. No dead individuals were recorded when distilled water was used, and the J2 presented movement as shown in Figure 1A; however, with the anthelmintic (Levamisole), 100% mortality was recorded at 24 h of exposure (Figure 1B) with statistically significant differences (\*p ≤ 0.05) with respect to the lowest concentrations of

microplaca con 96 pocillos. Las concentraciones finales de la fracción fueron de 0.039, 0.078, 0.156, 0.132, 0.625 y 1.25 mg mL<sup>-1</sup> y los controles, que consistían en agua destilada y Levamisol (antihelmíntico comercial 5 mg mL<sup>-1</sup>) en un volumen de 100 µL (n=4). Los J2 fueron expuestos por 24 h, después de lo cual se tomaron 10 alícuotas de 10 µL de cada repetición, y se contabilizó el número de individuos muertos y vivos. El número de individuos muertos se usó para calcular el porcentaje de mortalidad con la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{ mortalidad de nematodos} = \frac{\text{nematodos muertos}}{\text{nematodos muertos} + \text{nematodos vivos}} \times 100$$

Los datos se analizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) con el modelo lineal general y una comparación de medias con la prueba de Tukey (\*p ≤ 0.05). El software STATGRAPHICS Centurion XV, V. 15.2.06 se usó para los procedimientos estadísticos.

La mortalidad de los J2 de *M. enterolobii* aparece en el Cuadro 1. No se registraron individuos muertos al usar agua destilada y presentaron movimiento, tal como lo ilustra la Figura 1A. No obstante, con el antihelmíntico (Levamisol) se registró una mortalidad de 100% tras 24 h de exposición (Figura 1B) con diferencias estadísticamente significativas (\*p ≤ 0.05) con respecto a las concentraciones más bajas de la fracción PdR-2 (0.039, 0.078 y 0.156 mg mL<sup>-1</sup>) y agua. La mortalidad para las concentraciones más bajas fueron de 40.3 a 65%. Por otro lado, las concentraciones de 0.156, 0.132, 0.625 y 1.25 mg mL<sup>-1</sup> de la fracción PdR-2 presentaron porcentajes de mortalidad más altos (76.8–86.3%) y éstos fueron significativamente diferentes al control de agua (\*P ≤ 0.05).

Investigaciones recientes para el control de *M. enterolobii* se ha concentrado en la búsqueda de

**Table 1. Mortality of J2 of *Meloidogyne enterolobii* caused by the *Pleurotus djamor* PdR-2 fraction at 24 h after exposure.****Cuadro 1. Mortalidad de J2 de *Meloidogyne enterolobii* causada por la fracción PdR-2 de *Pleurotus djamor* 24 h después de la exposición.**

| Treatment        | Concentration (mg mL <sup>-1</sup> ) | Mortality percentage (%) <sup>y,z</sup> |
|------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O | -                                    | 0±0 <sup>a</sup>                        |
| Levamisole       | 5                                    | 100±0 <sup>c</sup>                      |
|                  | 0.039                                | 40.3±5.6 <sup>b</sup>                   |
|                  | 0.078                                | 65.1±5.9 <sup>c</sup>                   |
|                  | 0.156                                | 76.9±7.1 <sup>cd</sup>                  |
| PdR2 Fraction    | 0.132                                | 87.6±3.7 <sup>de</sup>                  |
|                  | 0.625                                | 84.6±4.7 <sup>de</sup>                  |
|                  | 1.25                                 | 86.3±10.5 <sup>de</sup>                 |

<sup>y</sup>Data represent the mean ± standard deviation of four replicates. / <sup>y</sup>Datos representan la media ± desviación estándar de cuatro repeticiones.

<sup>z</sup>The same letters in a column indicate that the value does not differ statistically, according to Tukey's test (\*P≤ 0.05); n = 4. / <sup>z</sup>Las mismas letras en una columna indican que el valor no difiere estadísticamente, según la prueba de Tukey (\*P≤ 0.05); n = 4.



**Figure 1. J2 of *Meloidogyne enterolobii* exposed to H<sub>2</sub>O and levamisole for 24 h, observed under light microscopy (20X). A) J2 exposed to H<sub>2</sub>O and B) J2 exposed to levamisole.**

**Figura 1. J2 de *Meloidogyne enterolobii* expuesto a H<sub>2</sub>O y levamisol por 24 h, observados bajo un microscopio óptico (20X). A) J2 expuesto a H<sub>2</sub>O y B) J2 expuesto a levamisol.**

the PdR-2 fraction (0.039, 0.078, and 0.156 mg mL<sup>-1</sup>) and water. The mortality for the lowest concentrations were 40.3 to 65%. On the other hand, concentrations of 0.156, 0.132, 0.625, and

cultivos resistentes a este fitonemátodo, dado que esta especie puede reproducirse en diferentes cultivos que poseen los genes de resistencia disponibles en la actualidad para las especies principales

1.25 mg mL<sup>-1</sup> of the PdR-2 fraction showed higher mortality percentages (76.8–86.3%), and these were significantly different from the water control (\*P ≤ 0.05).

Currently, research carried out for the control of *M. enterolobii* has focused on the search for crops resistant to this phytonematode, given that this species is able to reproduce in different crops that possess the resistance genes currently available for the main species of *Meloidogyne*. Some of these genes are *Mel-Me6*, *Mech1* and *Mech2*; however, it has been reported that *M. enterolobii* can infect plants with these *Meloidogyne*-resistant genes (Carrillo-Fasio *et al.*, 2020; Philbrick *et al.*, 2020). Therefore, another sustainable alternative for the control of this nematode could be the use of compounds isolated from edible mushrooms.

Several species of edible mushrooms belonging to the genus *Pleurotus* have been shown to possess nematocidal properties; such studies have been conducted mainly in the livestock area using gastrointestinal nematode models of small ruminants, reporting a new line of research to be addressed to demonstrate their effectiveness in the sustainable control of these parasites (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020). The nematocidal activity is attributed to secondary metabolites, such as fatty acids, isolated from *P. djamor* species (e.g., linoleic acid) (Pineda-Alegria *et al.*, 2017). Other secondary metabolites, such as polyols, trehalose, mannitol, squalene, stearic acid, and β-sitosterol, have been isolated from *P. eryngii* (Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). Regarding the PdR-2 fraction obtained from *P. djamor* (ECS-0127) was reported in a study by González-Cortázar *et al.* (2020), 100% lethal nematocidal activity was reported against eggs and infective larvae (L3) of *H. contortus* in *in vitro* experiments. Similarly, *in vivo* evaluation of the PdR-2 fraction reached a reduction of up to 80% of the *H. contortus* parasite load using as a study

de *Meloidogyne*. Algunos de estos genes son *Mel-Me6*, *Mech1* y *Mech2*. Sin embargo, se ha reportado que *M. enterolobii* puede infectar a plantas con estos genes resistentes a *Meloidogyne* (Carrillo-Fasio *et al.*, 2020; Philbrick *et al.*, 2020). Por lo tanto, otra alternativa sustentable para el control de este nemátodo podría ser el uso de compuestos aislados de hongos comestibles.

Varias especies de hongos comestibles pertenecientes al género *Pleurotus* han demostrado tener propiedades nematocidas. Tales estudios han sido desarrollados principalmente en el área ganadera, con el uso de modelos de nemátodos gastrointestinales de rumiantes pequeños, con lo que se reporta una nueva línea de investigación a ser tratada para demostrar su efectividad en el control sustentable de estos parásitos (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020). La actividad nematocida se atribuye a metabolitos secundarios tales como ácidos grasos aislados de especies de *P. djamor* (p. ej., ácido linoleico) (Pineda-Alegria *et al.*, 2017). Otros metabolitos secundarios, tales como polioles, trehalosa, manitol, escualeno, ácido esteárico y β-sitosterol, han sido aislados de *P. eryngii* (Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). Con respecto a la fracción de PdR-2 obtenida de *P. djamor* (ECS-0127) en un estudio de González-Cortázar *et al.* (2020), se reportó una actividad nematocida de 100% contra huevos y larvas infecciosas (L3) de *H. contortus* en experimentos *in vitro*. De manera similar, una evaluación *in vivo* de la fracción PdR-2 alcanzó una reducción de hasta 80% de la carga parasitaria de *H. contortus*, usando como modelo de estudio el jерbo *Meriones unguiculatus*. Por último, el compuesto responsable de la actividad nematocida de la fracción PdR-2 se identificó como alitol y un terpeno en proporción 9:1 por análisis espectroscópico de protón (<sup>1</sup>H) y carbono (<sup>13</sup>C) de resonancia magnética nuclear (RMN).

La mayoría de los trabajos de investigación en los que se ha explorado el uso de los metabolitos



model the gerbil *Meriones unguiculatus*. Finally, the compound responsible for the nematocidal activity of the PdR-2 fraction was identified as allitol and a terpene in a 9:1 ratio by nuclear magnetic resonance (NMR) proton ( $^1\text{H}$ ) and carbon ( $^{13}\text{C}$ ) spectroscopic analysis.

Most of the research works where the use of *Pleurotus* mushroom metabolites has been explored are focused on *Meloidogyne* spp., such as *M. javanica* (Heydari *et al.*, 2006; Oka, 2001); however, for the recently reported species in Mexico, *M. enterolobii*, research for its management is required. Therefore, our research provides relevant information. At a concentration of  $0.132\text{ mg mL}^{-1}$ , mortality percentages higher than 84% were obtained on J2s of *M. enterolobii*. Similar results were reported by Li *et al.* (2007), who isolated three metabolites from *P. ferulae* extracts with a nematocidal effect on *Bursaphelenchus xylophilus* and *Panagrellus redivivus*. Of these, only the compound cheimonophyllon E registered 84% mortality on *B. xylophilus* at 72 h, while the PdR-2 fraction evaluated in this work registered a similar percentage at 24 h. Therefore, The PdR2 fraction showed nematocidal effect against J2s larvae of *M. enterolobii* and could potentially be used for the sustainable control of nematodes of agricultural importance.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The present research article was partial financed by the National Problems project, National Council of Science and Technology (CONACYT in Spanish), project number 9342634372.

#### LITERATURE CITED

Abd-Elgawad MMM and Askary TH. 2015. Impact of phytoneematodes on agriculture economy. pp. 3–49. In: Askary TH and Martinelli PRP (Eds.). Biocontrol agents of phytoneematodes. Wallingford, UK: CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780643755.0003>.

del hongo *Pleurotus* se han concentrado en *Meloidogyne* spp., tales como *M. javanica* (Heydari *et al.*, 2006; Oka, 2001). Por otra parte, para la especie reportada de manera reciente en México, *M. enterolobii*, se requiere investigación para su manejo. Por lo tanto, la presente investigación brinda información relevante. A una concentración de  $0.132\text{ mg mL}^{-1}$ , los porcentajes de mortalidad mayores a 84% se obtuvieron en J2s de *M. enterolobii*. Resultados similares fueron reportados por Li *et al.* (2007), quienes aislaron tres metabolitos de extractos de *P. ferulae* con un efecto nematocida sobre *Bursaphelenchus xylophilus* y *Panagrellus redivivus*. De éstos, solo cheimonophyllon E registró una mortalidad de 84% sobre *B. xylophilus* a las 72 h, mientras que la fracción evaluada en este trabajo registró un porcentaje similar a las 24 h. Por lo tanto, la fracción PdR2 podría ser usada para el control sustentable de nematodos de importancia agrícola, ya que presentó un efecto nematocida sobre juveniles del segundo estadio de *M. enterolobii*.

#### AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue parcialmente financiada por el proyecto Problemas Nacionales, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de proyecto 9342634372.

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

Akhtar M and Malik A. 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology* 74:35–47. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00154-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00154-6)
Barron GL and Thorn RG. 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany* 65:774–778. <https://doi.org/10.1139/b87-103>
Carrillo-Fasio JA, Martínez-Gallardo JA, Allende-Molar R, Velarde-Félix S, Romero-Higareda CE and Retes-Manjarrez JE. 2019. Distribution of *Meloidogyne* species

- (Tylenchida: Meloidogynidae) in tomato crop in Sinaloa, Mexico. *Nematropica* 49:71–82. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/115619>
- Carrillo-Fasio JA, Martínez-Gallardo JA, Ayala-Tafuya F, López-Orona CA, Allende-Molar R and Retes-Manjarrez JE. 2020. Screening for resistance to *Meloidogyne enterolobii* in *Capsicum annuum* landraces from Mexico. *Plant Disease* 104(3): 817–822. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0718-RE>
- Castagnone-Sereno P. 2012. *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. *Nematology* 14: 133–138. <https://doi.org/10.1163/156854111X601650>
- Castañeda-Ramírez GS, Torres-Acosta FJ, Sánchez JE, Mendoza de Gives P, González-Cortazar M, Zamilpa A, Al-Ani LKT, Sandoval-Castro C, Soares FEF and Aguilar-Marcelino L. 2020. Biotechnological use of edible mushrooms bio-products for controlling plant and animal parasitic nematodes. *Biomed Research International* 6078917: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/6078917>
- Cid del Prado-Vera I, Franco-Navarro F and Godínez-Vidal D. 2018. Plant parasitic nematodes and management strategies of major crops in Mexico. pp. 31–68. *In: Subbotin SA and Chitambar JJ (Eds.), Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America, sustainability in plant and crop protection. Switzerland: Springer Nature.* https://doi.org/10.1007/978-3-319-99585-4_2
- Cohen R, Persky L and Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(5): 582–94. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0930-y>
- Cruz-Arévalo J, Sánchez JE, González-Cortázar M, Zamilpa A, Andrade-Gallegos RH, Mendoza de Gives P and Aguilar-Marcelino L. 2020. Chemical composition of an anthelmintic fraction of *Pleurotus eryngii* against eggs and infective Larvae (L3) of *Haemonchus contortus*. *Biomed Research International* 4138950: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/4138950>
- Genier HLA, de Freitas SFE, de Queiroz JH, de Souza GA, Araújo JV, Braga FR, Pinheiro IR and Kasuya MCM. 2015. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *African Journal of Biotechnology* 14(17): 1496–1503. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14447>
- González-Cortazar M, Sánchez JE, Huicochea-Medina M, Hernández-Velázquez VM, Mendoza-de-Gives P, Zamilpa A, López-Arellano ME, Pineda-Alegria JA and Aguilar-Marcelino L. 2020. *In vitro* and *in vivo* nematicide effect of *Pleurotus djamor* fruiting bodies against *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food* 24(3): 310-318. <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0054>
- Heydari R, Pourjarn E and Mohammadi EG. 2006. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* *in vitro*. *Plant Pathology Journal* 5(2):v173–177. <https://doi.org/10.3923/ppj.2006.173.177>
- Kwok OCH, Plattner R, Weisleder D and Wichlow DT. 1992. A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal Chemical Ecology* 18: 127–136. <https://doi.org/10.1007/BF00993748>
- Li G, Wang X, Lijun L, Li L, Huang R and Zhang K. 2007. Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. *Annals of Microbiology* 57(4):v527–529. <https://doi.org/10.1007/BF03175350>
- Moens M, Perry RN and Starr JL. 2009. *Meloidogyne* Species – a diverse group of novel and important plant parasites. *In: Perry RN, Moens M and Starr JL (Eds.). Root-knot nematodes (pp.1-17).* Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2009/20093330181.pdf>
- Oka Y. 2001. Nematicidal activity of essential oil components against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology* 3:159–164.
- Philbrick AN, Adhikari TB, Louws FJ and Gorny AM. 2020. *Meloidogyne enterolobii*, a major threat to tomato production: current status and future prospects for its management. *Frontiers in Plant Science* 11: 606395. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.606395>
- Pineda-Alegria JA, Sánchez-Vázquez JE, González-Cortazar M, Zamilpa A, López-Arellano ME, Cuevas-Padilla EJ, Mendoza-de-Gives P and Aguilar-Marcelino L. 2017. The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food* 20: 1184–1192. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0031>
- Ramirez-Suarez A, Rosas-Hernandez L, Alcasio-Rangel S and Powers TO. 2014. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* parasitizing watermelon from Veracruz, México. *Plant Disease* 98(3): 428. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0636-PDN>
- Romero M, Macías MG, Carrillo FJA, Rojas CM, Hernández RJS and Duarte OJD. 2019. Identificación y distribución de especies de *Meloidogyne* en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(2): 337–349. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.1603>
- Samsam-Shariat H, Farid H and Kavianpour M. 1994. A study of the anthelmintic activity of aqueous extract of *Pleurotus eryngii* on *Syphacia obvelata* and *Hymenolepis nana*. *Journal of Science, Islamic Republic of Iran* 5:19–22. https://jsciences.ut.ac.ir/article_31372.html
- Villar-Luna E, Gómez-Rodríguez O, Rojas-Martínez RI and Zavaleta-Mejía E. 2016. Presence of *Meloidogyne enterolobii* on jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, Mexico. *Helminthologia* 53: 155–160. <https://doi.org/10.1515/helmin-2016-0001>
- Vrain TC. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal of Nematology* 9: 249–251. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620246/>
- Wong-Villarreal A, Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Aguilar-Marcelino L, García DC, García-Maldonado JQ, Hernández-Velázquez VM, Yañez-Ocampo G, Espinosa-Zaragoza S, I Ramírez-González S, Sanzón-Gómez D. 2021. Nematicidal Activity of the Endophyte *Serratia ureilytica* against *Nacobbus aberrans* in Chili Plants (*Capsicum annuum* L.) and Identification of Genes Related to Biological Control. *Plants (Basel)*. 10(12): 2655. <https://doi.org/10.3390/plants10122655>.

Omics applications in plant-microorganism interactions: A view from plant genomics

Aplicaciones Ómicas en la interacción Planta-Microorganismos: Una visión desde la genómica vegetal

June Simpson*, Emmanuel Avila de Dios, Alan D. Gómez Vargas, Arely V. Pérez-López, Andrea Castro Mexicano, Yoselin Meléndez Barraza, Laura Hernández Soriano, Laura Gálvez Sandré, M. Erendira López Rosas, Rocío Medina Chávez, Katia D.C. Gil-Vega, Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, CP 36821, México.

*Corresponding author: june.simpson@cinvestav.mx

Received: March 23, 2021.

Accepted: April 13, 2022.

Simpson J, Avila de Dios E, Gómez VAD, Pérez-López AV, Castro MA, Meléndez BY, Hernández SL, Gálvez SL, López RME, Medina CR and Gil-Vega KDC. 2022. Omics applications in plant-microorganism interactions: A view from plant genomics. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(2): 263-269.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-7>

Primera publicación DOI: 28 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 28, 2022.

Abstract. The advent of next generation sequencing has opened up the possibility to carry out detailed molecular genetic analysis on non-model species. Here we present strategies to carry out RNAseq analysis in *Agave tequilana* which for the first time have permitted the identification and characterization of genes involved in fructan metabolism and flowering time in *Agave* species. Based on *in silico* data, expression patterns for individual genes could be determined and

Resumen. El desarrollo de la secuenciación de nueva generación ha abierto la posibilidad de llevar a cabo análisis genéticos moleculares detallados en especies no-modelo. Aquí se presentan estrategias para llevar a cabo análisis de RNAseq en *Agave tequilana* que por primera vez han permitido la identificación y caracterización de genes involucrados en el metabolismo de fructanos y el tiempo de floración en especies de *Agave*. Basándose en datos *in silico*, los patrones de expresión de genes individuales fueron determinados y luego confirmados mediante qRT-PCR. Además, los cDNA's correspondientes a genes de interés fueron clonados y caracterizados funcionalmente en sistemas heterólogos como *Pichia pastoris* y *Arabidopsis thaliana*. También se presentan datos obtenidos por análisis de RNAseq del patosistema *C. lindemuthianum*-*P. vulgaris*. Usando cepas de *C. lindemuthianum* que expresan la proteína fluorescente verde, es sencillo dar seguimiento al proceso de infección y se llevó a cabo RNAseq en diferentes etapas del proceso inicial de infección por *C. lindemuthianum* en *P.*

later confirmed by qRT-PCR and cDNA's of genes of interest were cloned and functionally characterized in heterologous systems such as *Pichia pastoris* and *Arabidopsis thaliana*. We also present data obtained by RNAseq analysis of the *C. lindemuthianum*-*P. vulgaris* pathosystem. Using strains of *C. lindemuthianum* expressing the green fluorescent protein, the infection process can easily be followed. RNAseq was carried out at different time points during the initial stages of infection by *C. lindemuthianum* on *P. vulgaris* cultivar BAT93 using virulent or non-virulent races of *C. lindemuthianum* (Race 1088 and Race 256 respectively). Differentially expressed genes specific to compatible and non-compatible reactions could therefore be identified.

Key words: *Agave*, RNA-seq, cDNA cloning, *C. lindemuthianum/P.vulgaris*, infection process, virulence/avirulence

The development of affordable “new generation” sequencing methods and the bioinformatic capacity to analyze the large amounts of data obtained, have unleashed the potential to carry out detailed genetic analysis in non-model organisms which were previously inaccessible. Our model of study is *Agave tequilana*, however the strategy we used can be applied to most organisms including plant, fungal, bacterial or insect species. Although *A. tequilana* is an important crop in Mexico predicted to generate around 6 billion dollars in profit annually by 2024 from tequila production, the perennial, monocarpic life cycle of this species, the practice of removing immature inflorescences in the field and the strict control by the Tequila Regulatory Council over the germplasm grown have led to a situation where a single cultivar (*A. tequilana* Weber var. azul) is reproduced asexually and grown over 95,000 hectares in the 5 Mexican

vulgaris cultivar BAT93 usando razas virulentas o no virulentas de *C. lindemuthianum* (Raza 1088 y Raza 256 respectivamente). Por lo tanto, pudieron identificarse genes expresados diferencialmente y específicos para reacciones compatibles y no compatibles.

Palabras clave: *Agave*, ARN-seq, clonación cADN, *C. lindemuthianum/P.vulgaris*, proceso de infección, virulencia/avirulencia

El desarrollo de métodos accesibles de secuenciación de “nueva generación” y la capacidad bioinformática para analizar la gran cantidad de datos obtenidos han desencadenado el potencial para realizar análisis genéticos detallados en organismos no modelo que antes eran inaccesibles. Nuestro modelo de estudio es *Agave tequilana*. Sin embargo, la estrategia que utilizamos se puede aplicar a la mayoría de los organismos, incluyendo especies de plantas, hongos, bacterias o insectos. *Agave tequilana* es un cultivo importante en México que se prevé que genere alrededor de 6 billones de dólares en ganancias anuales para 2024 de la producción de tequila. Sin embargo, el ciclo de vida perenne y monocárpico de esta especie, junto con la práctica de eliminar las inflorescencias inmaduras en el campo y el estricto control ejercido por El Consejo Regulador del Tequila sobre el germoplasma cultivado, ha llevado a una situación en la que un solo cultivar (*A. tequilana* Weber var. azul) se reproduce asexualmente y se cultiva en 95,000 hectáreas en los cinco estados mexicanos autorizados para la producción de tequila con el certificado de “Denominación de Origen”. Se han implementado muy pocos programas de mejoramiento en especies de agave y no se han desarrollado cultivares mejorados ya sea en términos de rendimiento, producción de azúcar, control de floración o resistencia a plagas y patógenos. La resistencia a enfermedades y

states authorized under “Denomination of Origin” for tequila production. Very few breeding programs have been implemented in agave species and no improved cultivars have been developed either for yield in terms of sugar production, control of flowering or resistance to pests and pathogens. Disease and pest resistance are of particular importance given the practice of exploiting a single genotype over thousands of hectares making agave plantations extremely vulnerable to attack. Our initial omics analyses have focused on unraveling the genetics of sugar (fructan) metabolism and control of flowering in *A. tequilana*.

Strategy

For many crop plants such as corn, beans, tomato (Hirsch and Buell, 2013) among others, the determination of a whole genome sequence in order to carry out genetic analysis has been feasible, however, *A. tequilana* has a genome content of almost twice the size (4000Mb) (Palomino *et al.*, 2007) of corn and development and construction of a whole genome sequence is still technically challenging. Therefore, our initial strategy was to develop methods for transcriptome (RNAseq) analysis in agave species. Transcriptome analysis offers the advantages that less data needs to be generated and processed lowering costs. Additionally, data can be related to tissue types or developmental stages providing information on expression levels of specific genes under specific conditions. We have generated transcriptome data for *A. tequilana*, *A. deserti*, *A. striata* and *A. victoria-reginae* (Ávila de Dios *et al.*, 2015) and using this information have identified, cloned and characterized the cDNAs (coding sequences) responsible for the regulation of fructan metabolism and some members of a family of genes involved in the regulation of flowering time in *A. tequilana*.

plagas es de particular importancia dada la práctica de explotar un solo genotipo en miles de hectáreas, lo que hace que las plantaciones de agave sean extremadamente vulnerables a los ataques de patógenos. Nuestros análisis ómicos iniciales se centraron en estudiar a profundidad la genética del metabolismo del azúcar (fructano) y el control de la floración en *A. tequilana*.

Estrategia

En muchas plantas de cultivo como maíz, frijol, jitomate (Hirsch y Buell, 2013), entre otros, ha sido posible la determinación de la secuencia genómica completa para realizar análisis genéticos. Sin embargo, *A. tequilana* tiene un contenido genómico de casi dos veces el tamaño (4000Mb) (Palomino *et al.*, 2007) que el del maíz y el desarrollo y la construcción de su secuencia genómica completa sigue siendo un desafío técnico. Por lo tanto, nuestra estrategia inicial fue desarrollar métodos para el análisis del transcriptoma (RNAseq) en especies de agave. El análisis del transcriptoma ofrece la ventaja de que la necesidad de generar y procesar menos datos, reduce los costos. Además, los datos se pueden asociar con tipos de tejidos o etapas de desarrollo, proporcionando información sobre los niveles de expresión de genes específicos bajo ciertas condiciones específicas. Nosotros hemos generado datos transcriptómicos para *A. tequilana*, *A. deserti*, *A. striata* y *A. victoria-reginae* (Ávila de Dios *et al.*, 2015). Con esta información hemos identificado, clonado y caracterizado los ADNc (secuencias codificantes) responsables de la regulación del metabolismo de los fructanos y algunos miembros de una familia de genes involucrados en la regulación del tiempo de floración en *A. tequilana*.

Se identificaron un total de 15 genes implicados en el metabolismo de fructanos/sacarosa y se clasificaron como enzimas codificantes para la síntesis de

A total of 15 genes involved in fructan/sucrose metabolism were identified and classified as encoding fructan synthesizing enzymes, fructan degrading enzymes or invertases. Genetic transformation of agave species is still laborious and inefficient and therefore we are using heterologous systems such as *P. pastoris* and *A. thaliana* in order to functionally characterize the identified genes/enzymes. *In silico* expression patterns based on transcriptome data indicate which genes are expressed in specific tissues or during specific developmental stages indicating their relative importance in different processes or metabolism. Based on these data we have determined and compared expression patterns for each of the fructan metabolism genes and most of these *in silico* expression patterns have now been confirmed by qRT-PCR (Ávila de Dios *et al.*, 2019, Pérez-López *et al.*, 2021).

By employing a similar strategy, genes from several families known to be involved in the regulation of flowering time in the model system *A. thaliana* (FT, gibberellin metabolism, MYB factors) were also identified in *A. tequilana* and based on *in silico* expression patterns a working model for regulation of flowering in *A. tequilana* was proposed (Ávila de Dios *et al.*, 2019). Currently we are functionally characterizing in detail the *A. tequilana* FT family.

An example of preliminary omics analysis in *Colletotrichum lindemuthianum*

The *C. lindemuthianum* - common bean pathosystem involves a gene-for-gene interaction between resistance (R) genes in the common bean host cultivars and avirulence (avr) genes in the fungal pathogen. Previous work in our group identified many distinct *C. lindemuthianum* races based on the differential series of common bean cultivars (González *et al.*, 1998, Mendoza *et al.*,

fructanos, enzimas de degradación de fructanos o invertasas. La transformación genética de las especies de agave es todavía muy laboriosa e ineficiente, por lo tanto, se han utilizado sistemas heterólogos como *Pichia pastoris* y *Arabidopsis thaliana* para caracterizar funcionalmente los genes/enzimas identificados. Los patrones de expresión *in silico* basados en datos transcriptómicos indican cuales genes se expresan en tejidos específicos o durante etapas de desarrollo específicas, indicando su importancia relativa en diferentes procesos o en el metabolismo. Basados en estos datos, hemos determinado y comparado los patrones de expresión de cada uno de los genes del metabolismo de los fructanos. La mayoría de estos patrones de expresión *in silico* han sido confirmados por qRT-PCR (Ávila de Dios *et al.*, 2019, Pérez-López *et al.*, 2021).

Empleando una estrategia similar, con base en patrones de expresión *in silico*, se identificaron también en *A. tequilana* genes de varias familias que se sabe que están involucradas en la regulación del tiempo de floración en el sistema modelo *A. thaliana* (FT, metabolismo de giberelinas, factores MYB). Se propuso un modelo de trabajo para la regulación de la floración en *A. tequilana* (Ávila de Dios *et al.*, 2019). Actualmente se está caracterizando funcionalmente a detalle la familia *A. tequilana* FT.

Un ejemplo de análisis ómico preliminar en *Colletotrichum lindemuthianum*

El patosistema *C. lindemuthianum* - frijol común implica una interacción gen por gen entre los genes de resistencia (R) en los cultivares hospedantes de frijol común y los genes de avirulencia (avr) en el patógeno fúngico. En trabajos previos de nuestro grupo identificamos muchas razas distintas de *C. lindemuthianum* basados en las series diferenciales de cultivares de frijol común (González *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2001; Rodríguez-Guerra *et*

2001, Rodríguez-Guerra *et al.*, 2003, González-Chavira *et al.*, 2004). We initiated a transcriptome strategy to compare the differential gene expression patterns at the early stages of infection on the common bean cultivar BAT93 inoculated with either a virulent or a non-virulent race (Race 1088 and Race 256 respectively) of *C. lindemuthianum* (Figure 1 and Table 1). Details of the experimental

et al., 2003; González-Chavira *et al.*, 2004). Nosotros iniciamos una estrategia de análisis transcriptómico para comparar los patrones diferenciales de expresión génica en las primeras etapas de la infección en el cultivar de frijol común BAT93 inoculado con una raza virulenta o no virulenta (Raza 1088 y Raza 256 respectivamente) de *C. lindemuthianum* (Figura 1 y Cuadro 1). Los detalles de la estrategia

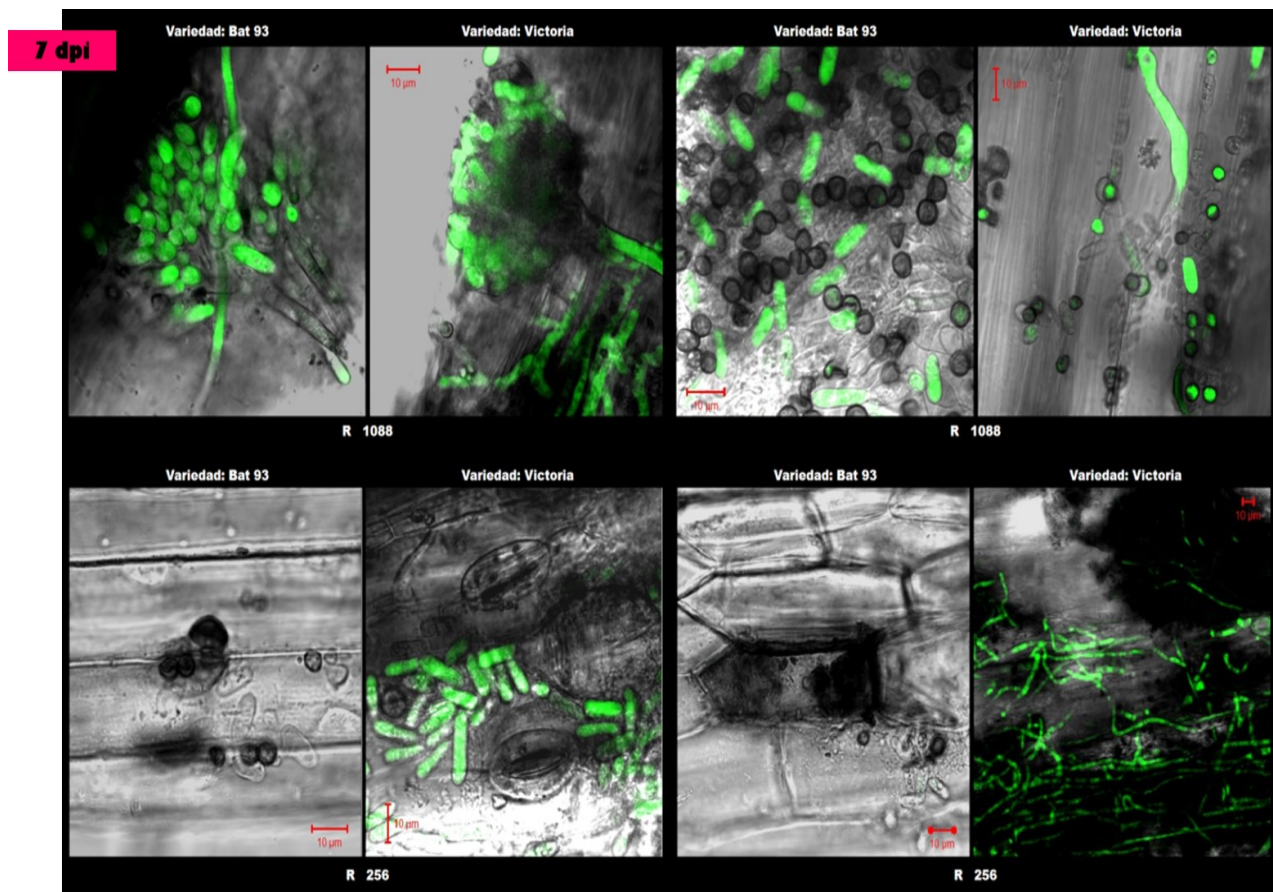


Figure 1. Microscopic analysis 7 days after inoculation of common bean seedlings with *Colletotrichum lindemuthianum*. In the upper left quadrant, the formation of reproductive structures (acervuli) by the pathogen is observed in the compatible interactions for both cultivars with strain 1088. On the right side for the same strain a large number of conidia and appresoria are shown. In the interactions with strain 256, a large number of hyphae are observed for the cultivar Victoria as well as the presence of young conidia on the necrotic tissue of the plant, whereas for the cultivar BAT 93, hypersensitive reactions caused by the defense response are observed with the localized death of cells in contact with the pathogen.

Figura 1. Análisis microscópico 7 días después de la inoculación de plántulas de frijol común con *Colletotrichum lindemuthianum*. En el cuadrante superior izquierdo se observa la formación de estructuras reproductivas (acérvulos) por parte del patógeno en las interacciones compatibles para ambos cultivares con la cepa 1088. Del lado derecho se muestra una gran cantidad de conidios y apresorios en la misma cepa. En las interacciones con la cepa 256 se observa gran cantidad de hifas del cultivar Victoria así como la presencia de conidios jóvenes sobre el tejido necrótico de la planta, mientras que, en el cultivar BAT 93 se observan reacciones de hipersensibilidad provocadas por la respuesta de defensa, incluyendo muerte localizada de células en contacto con el patógeno.

strategy are shown in Table 2. RNAseq was carried out on samples from each time point (samples from 4-96 hours were pooled) (Table 3) and the data was analyzed and compared in order to eventually identify genes expressed differentially during compatible and incompatible interactions (Medina-Chavez and Simpson unpublished).

Genomic and transcriptomic analyses are currently essential and cost-effective tools for

Table 1. Reactions of BAT93 and Victoria to inoculation of *C. lindemuthianum* Races 256 and 1088.
Cuadro 1. Reacciones de BAT93 y Victoria a la inoculación de *C. lindemuthianum* Razas 256 y 1088.

| Cultivar | Race | Reaction | Infection level |
|----------|------|--------------|-----------------|
| BAT93 | 1088 | Compatible | 4 |
| Victoria | | Compatible | 4 |
| BAT93 | 256 | Incompatible | 0 |
| Victoria | | Compatible | 4 |

Table 2. Summary of samples taken for RNAseq analysis.
Cuadro 2. Resumen de las muestras tomadas para el análisis de RNAseq.

| Compatibility | Sample time
15 min | Compatibility | Sample time
15 min | Compatibility | Sample time
15 min |
|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
| Incompatible | 30 min | Compatible | 30 min | Un-inoculated | 30 min |
| | 1 h | | 1 h | | 1 h |
| | 2 h | | 2 h | | 2 h |
| | 4 h | | 4 h | | 4 h |
| | 8 h | | 8 h | | 8 h |
| | 24 h | | 24 h | | 24 h |
| | 48 h | | 48 h | | 48 h |
| | 72 h | | 72 h | | 72 h |
| | 96 h | | 96 h | | 96 h |

genetic analysis and can easily be applied to plants and/or their pathogens. The *P. vulgaris*-*C. lindemuthianum* pathosystem is particularly amenable given the well -documented series of differential cultivars and corresponding *C. lindemuthianum* races. The recent release and ongoing analysis of several *P. vulgaris* genomes (Rendón-Anaya *et al.*, 2017) will greatly facilitate this research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from the Basic Science program from CONACyT (Grant CB-2005-01 #49281 & CB-2013-01 # 220339) and by a Grant # 131 SEP

Table 3. Summary of RNAseq results.
Cuadro 3. Resumen de los resultados de RNAseq.

| Compatibility | No. of reads | Total No. of Gb |
|---------------|--------------|-----------------|
| Incompatible | 33192887 | 230,040,125 |
| | 17997712 | |
| | 23569435 | |
| | 31022980 | |
| | 68634904 | |
| | 30262460 | |
| Compatible | 32000000 | |
| | 28907063 | |
| | 33087678 | |
| | 34510194 | |
| | 40019130 | |
| | 32603263 | |
| Un-inoculated | 28756807 | 195,579,782 |
| | 43056852 | |
| | 15635587 | |

CINVESTAV and all the students involved had a CONACyT Postgraduate Scholarship.

LITERATURE CITED

- Ávila de Dios E, Gomez VAD, Damián SML and Simpson J. 2015. New insights into plant glycoside hydrolase family 32 in Agave species. *Frontier Plant Science* 6:594. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00594>.
- Ávila de Dios, E Delaye AL and Simpson J. 2019. Transcriptome analysis of bolting in *A. tequilana* reveals roles for florigen, MADS, fructans and gibberellins. *BioMed Central Genomics* 20:473 <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5808-9>
- Hirsch CN and Buell CR. 2013. Tapping the promise of genomics in species with complex, nonmodel genomes. *Annual Review Plant Biology* 64:89-110. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120237>
- González M, Rodríguez R, Zavala ME, Jacobo JJ, Hernández F, Acosta J, Martínez O and Simpson J. 1998. Characterization of Mexican isolates of *C. lindemuthianum* using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88: 292-299. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.292>
- González-Chavira M, Rodríguez GR, Hernández-Godínez F, Acosta-Gallegos JA, Martínez de la Vega O and Simpson J. 2004. Analysis of Pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* Found in the Central Region of México and Resistance in Elite Germplasm of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Disease* 88; 152-156. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.152>
- Mendoza A, Hernández F, Hernández S, Ruiz D, Martínez de la Vega O, De la Mora G, Acosta J and Simpson J. 2001. Identification of Co-1 Anthracnose Resistance and Linked Molecular Markers in Common Bean Line A193. *Plant Disease* 85: 252-255. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.3.252>
- Palomino G, Martínez J and Méndez I. 2007. Variación inter e intraespecífica en especies de *Agave* por citometría de flujo y análisis de sus cromosomas. Pp:41-65. In: Colunga-GarcíaMarín P, Larqué SA, Eguiarte L y Zizumbo-Villarreal D (eds.). *En lo Ancestral hay Futuro: Del Tequila, los Mezcales y otros Agaves*. CONACyT, CONABIO, INE, ISBN: 978-968-6532-18-0 CICY, Mexico. 402p. <https://twitter.com/conabio/status/1441461910898098177>
- Pérez-López AV, Simpson J, Clench MR, Gomez-Vargas AD and Ordaz-Ortiz JJ. 2021. Localization and Composition of Fructans in Stem and Rhizome of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Frontier Plant Science* 11:608850 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.608850>
- Rendón-Anaya M, Montero-Vargas JM, Saburido-Álvarez S, Vlasova A, Capella-Gutierrez S, Ordaz-Ortiz JJ, Aguilar OM, Vianello-Bronzani RP, Santalla M, Delaye L, Gabaldon T, Gepts P, Winkler R, Guigó R, Delgado experimental se muestran en el Cuadro 2. RNAseq se llevó a cabo en muestras de cada punto temporal (se agruparon muestras de 4 a 96 horas) (Cuadro 3) y los datos se analizaron y compararon para eventualmente identificar genes expresados diferencialmente durante interacciones compatibles e incompatibles (Medina-Chávez y Simpson sin publicar).
- En conclusión, los análisis genómicos y transcriptómicos son actualmente herramientas esenciales y rentables para el análisis genético y pueden ser fácilmente aplicables a las plantas y/o sus patógenos. El patosistema *P. vulgaris*-*C. lindemuthianum* es particularmente susceptible a este tipo de análisis dada la bien documentada serie de cultivares diferenciales y sus correspondientes razas de *C. lindemuthianum*. Los estudios recientes y el análisis en curso de varios genomas de *P. vulgaris* (Rendón-Anaya *et al.*, 2017) facilitarán enormemente esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo apoyado por los FONDOS CIENCIA BÁSICA, CB-2005-01 #49281 y CB-2013-01 # 220339, y por el Fondo SEP CINVESTAV # 131 y todos los alumnos involucrados tuvieron beca de Posgrado de CONACyT.

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

Salinas A and Herrera-Estrella A. 2017. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biology* 18: 60. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1190-6>

Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Rueda MT, Martínez de la Vega O and Simpson J. 2003. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from México. *Plant Pathology* 52:228-235. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00808.x>

# Potassium silicate as a fungicide enhancer against *Botrytis cinerea* in blackberry

## Silicato de potasio como potencializador de fungicidas contra *Botrytis cinerea* en zarzamora

**Daniel Nieto-Angel**, <sup>1</sup>Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; **José Terrones-Salgado\***, Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida, Decanato de Ciencias Biológicas, Facultad de Agronomía, <sup>2</sup>Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur No. 1103, CP. 72410, Puebla, Puebla, México; **Santo Ángel Ortega-Acosta**, <sup>3</sup>Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero, Iguala de la Independencia, C.P. 40020, Guerrero, México; <sup>1</sup>**Candelario Ortega-Acosta**, <sup>1</sup>**Daniel Téliz-Ortiz**; <sup>2</sup>**Francisco Javier Sánchez-Ruiz**, Facultad de Ingeniería Ambiental; **Moisés Roberto Vallejo-Pérez**, CONACyT-Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Álvaro Obregón No. 64, Colonia Centro, San Luis Potosí, San Luis Potosí, CP 78000, México; <sup>3</sup>**Francisco Palemón-Alberto**; <sup>2</sup>**Luis Daniel Ortega-Martínez**, Facultad de Biotecnología.

\*Corresponding author: jose.terrones@upaep.mx.

Received: February 21, 2022.

Accepted: April 17, 2022.

Nieto-Angel D, Terrones-Salgado J, Ortega-Acosta SA, Ortega-Acosta C, Téliz-Ortiz D, Sánchez-Ruiz FJ, Vallejo-Pérez MR, Palemón-Alberto F and Ortega-Martínez LD. 2022. Potassium silicate as a fungicide enhancer against *Botrytis cinerea* in blackberry. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 270-283.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-4>

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 29, 2022.

**Abstract.** Blackberry gray mold, induced by *Botrytis cinerea*, is a fruit disease that causes important economic losses. The present study evaluated nine fungicides belonging to different

**Resumen.** El moho gris de la zarzamora causado por *Botrytis cinerea*, es una enfermedad que afecta los frutos y causa pérdidas económicas importantes. En la presente investigación se evaluaron nueve fungicidas pertenecientes a diferentes grupos químicos, solos y en combinación con silicato de potasio utilizando la dosis recomendada en la etiqueta para el control de *B. cinerea* en campo. Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad, además de grados Brix, concentración de silicio y rendimiento, el experimento se realizó dos veces. Los porcentajes de incidencia y severidad se transformaron a área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). El fungicida azoxystrobin combinado con silicato de potasio redujo la incidencia y severidad significativamente, presentando

chemical groups, alone and in combination with potassium silicate, using the dose recommended on the label for the control of *B. cinerea* in the field. The incidence and severity of the disease were evaluated, as well as the degrees Brix, silicon concentration, and yield. The experiment was carried out twice. Incidence and severity percentages were converted to area under the disease progress curve (AUDPC). Combined with potassium silicate, the fungicide azoxystrobin significantly reduced incidence and severity, showing the lowest percentages in the last evaluation of these variables. In the first repetition, the incidence and severity values were 4% (AUDPC = 1320) and 0.1% (AUDPC = 298.5), respectively. In the second, 3% (AUDPC = 1099) and 0.1% (AUDPC = 214.5) respectively. The concentration of soluble solids and fruit yield increased (12.4 and 13.6 t ha<sup>-1</sup> in the first and second repetition, respectively). The results indicate that potassium silicate enhances the effect of fungicides under field conditions and can thus be considered a management alternative against the gray mold disease in blackberries.

**Key words:** Silicon, AUDPC, incidence, severity, fungicides.

Blackberry (*Rubus* sp.) is a fruit crop grown in various regions throughout the world. However, blackberry production has suffered severe losses caused by diseases. Gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, is considered the most important pre- and post-harvest disease (Li *et al.*, 2012) of blackberries in Mexico and has been commonly reported in different blackberry producing regions (Terrones *et al.*, 2019).

The initial symptoms caused by *B. cinerea* in blackberries are soft, light-brown areas. The infected tissue later dries and mummifies.

los menores porcentajes en la última evaluación de dichas variables. En la primera repetición, los valores de incidencia y severidad fueron de 4% (ABCPE= 1320) y 0.1% (ABCPE= 298.5), respectivamente, y en la segunda 3% (ABCPE=1099) y 0.1% (ABCPE=214.5), respectivamente. Por lo tanto, aumentó la concentración de sólidos solubles y rendimiento (12.4 y 13.6 t ha<sup>-1</sup> en la primera y segunda repetición, respectivamente). Con base en los resultados obtenidos, se determinó que el silicato de potasio potencializa el efecto de los fungicidas bajo condiciones de campo, por lo tanto, puede ser una alternativa de manejo contra el moho gris en zarzamora.

**Palabras clave:** Silicio, ABCPE, incidencia, severidad, fungicidas.

La zarzamora (*Rubus* sp.), es un cultivo que se produce en diversas regiones del mundo, no obstante, la producción de zarzamora ha registrado severas pérdidas ocasionadas por enfermedades. El moho gris, causado por *Botrytis cinerea* se considera la enfermedad pre y postcosecha más importante (Li *et al.*, 2012) de la zarzamora en México y se ha reportado comúnmente en diferentes regiones productoras de dicho cultivo (Terrones *et al.*, 2019).

Los síntomas iniciales causados por *B. cinerea* en frutos son áreas suaves de color marrón claro, posteriormente el tejido infectado se seca y se momifica; en esta etapa se desarrollan abundantes conidióforos y conidios del hongo que producen una apariencia de moho gris (Carisse *et al.*, 2015). El hongo produce infecciones quiescentes que permiten que la enfermedad se manifieste después de la cosecha (Calvo-Garrido *et al.*, 2014). Por lo que las acciones de manejo de la enfermedad deben iniciarse en precosecha (Fillinger y Walker, 2016; Kim *et al.*, 2016). El control químico es el principal

Abundant conidiophores and conidia develop at this stage, producing the appearance of gray mold (Carisse *et al.*, 2015). The fungus causes quiescent infections in which the disease manifests after harvest (Calvo-Garrido *et al.*, 2014). Therefore, disease management actions must begin before harvest (Fillinger and Walker, 2016; Kim *et al.*, 2016). Chemical control is the main control method against this disease. The use of fungicides against gray mold represents 8% of the global fungicide market (Fillinger and Walker, 2016). In Mexico, the products authorized for use in the control of blackberry gray mold, in compliance with US and European Union regulations, are fenhexamid, captan, pyrimethanil, fludioxonil, boscalid, azoxystrobin, and iprodione (ANEBERRIES, 2021). These fungicides, which are applied at intervals of 7-14 days, increase production costs and can exert selection pressure on resistant populations (Fernández-Ortuño, 2014).

The need to minimize the use of fungicides has led to the search for control alternatives, including Silicon (Si), which modifies plant cell wall properties (Iwasaki *et al.*, 2002). When reinforced with Si, this mechanical defense significantly reduces the damage caused by insects and pathogens, mitigating the intensity of various diseases (Rodríguez *et al.*, 2015). This method has reduced the incidence and severity of gray mold in cucumber (*Cucumis sativus*) and strawberry (*Fragaria* spp.) (Lopes *et al.*, 2014). Furthermore, the foliar application of Si prevents the penetration of phytopathogenic fungi by activating the natural defenses of plants, mainly the expression of resistance genes (Fauteux *et al.*, 2005).

Several studies have focused on the mitigation of plant diseases using Si. However, to date there no formal study has focused on the use of potassium silicate in blackberry plants to control gray mold. The present study aimed to evaluate the control

método de combate para la enfermedad y el uso de fungicidas contra el moho gris, representa el 8% del mercado mundial de fungicidas (Fillinger y Walker, 2016). En México, los productos de uso autorizado para el control del moho gris en zarzamora en cumplimiento con EE. UU. y con la Unión Europea son fenhexamid, captan, pirimethanil, fludioxonil, boscalid, azoxystrobin e iprodione (ANEBERRIES, 2021). Estos fungicidas se aplican a intervalos de 7-14 días, incrementan los costos de producción y pueden ejercer presión de selección de poblaciones resistentes (Fernández-Ortuño, 2014).

La necesidad de minimizar el uso de fungicidas conlleva a la búsqueda de alternativas de control, como el uso del Silicio (Si) el cual modifica las propiedades de la pared celular de la planta (Iwasaki *et al.*, 2002); esta defensa mecánica en las plantas reforzada con Si, reduce significativamente el daño causado por insectos y patógenos disminuyendo la intensidad de diversas enfermedades (Rodríguez *et al.*, 2015), y ha reducido la incidencia y severidad del moho gris en pepino (*Cucumis sativus*) y fresa (*Fragaria* spp.) (Lopes *et al.*, 2014). Además, la aplicación foliar de Si, inhibe la penetración de hongos fitopatógenos, activando las defensas naturales de plantas, principalmente la expresión de genes de resistencia (Fauteux *et al.*, 2005).

Existen diversos estudios sobre la disminución de enfermedades en plantas con Si, sin embargo, a la fecha no existe un reporte formal sobre la aplicación de silicato de potasio en plantas de zarzamora para el control del moho gris. Por lo que, el objetivo de este estudio fue evaluar el control de dicha enfermedad en campo utilizando nueve fungicidas de diferentes grupos químicos, solos y en combinación con silicato de potasio para potencializar su efecto contra *B. cinerea*.

En una parcela experimental con plantas de zarzamora cv. Tupi en etapa de madures fisiológica, se evaluaron nueve fungicidas de diferentes grupos

of this disease in the field using nine fungicides from different chemical groups, alone and in combination with potassium silicate to potentiate their effect against *B. cinerea*.

Nine fungicides from different chemical groups were evaluated in an experimental plot with blackberry plants cv. Tupi in the physiological maturity stage: fluazinam (SHOGUN 500<sup>®</sup>, Syngenta) at a dose of 1 L ha<sup>-1</sup>; fenhexamid (ELEVAT<sup>®</sup>, UPL) at 1.5 kg ha<sup>-1</sup>; thiophanate-methyl (CERCOBIN M<sup>®</sup>, Basf) at 1 kg ha<sup>-1</sup>; captan (CAPTAN 50 WP<sup>®</sup>, Adama) at 2.5 kg ha<sup>-1</sup>; pyrimethanil (SCALA 400 SC<sup>®</sup>, Bayer CropScience) at 2 L ha<sup>-1</sup>; cyprodinil + fludioxonil (SWITCH<sup>®</sup> 62.5 WG, Syngenta) at 1 kg ha<sup>-1</sup>; boscalid (CANTUS<sup>®</sup>, Basf) at 1 kg ha<sup>-1</sup>; azoxystrobin (IMPALA<sup>®</sup> 25 SC, Adama) at 0.75 L ha<sup>-1</sup>; iprodione (ROVRAL<sup>®</sup> 50 PH, FMC) at 1 kg ha<sup>-1</sup>; control solution (sterile distilled water). These treatments were applied alone and in combination with potassium silicate (SUPA SILICA<sup>®</sup>, Agrisolver) at 0.5 L ha<sup>-1</sup>. The plot where the study was carried out had a history of presence of gray mold. An isolate of *Botrytis cinerea* (GenBank access number MG838557) had been previously collected and morphologically and molecularly characterized (Terrones *et al.*, 2019). The fungicides, alone and in combination with potassium silicate, were applied at intervals of 15 days, starting in October 2019 and the second repetition was carried out in June 2020 until the end of the harvest in both cases. A total of six applications were made on each repetition using a motorized sprinkler (MS072H, Maruyama<sup>®</sup>) with a hollow cone nozzle previously calibrated to deliver a volume of 800 L ha<sup>-1</sup>.

An evaluation was carried out prior to the applications of the treatments, and six evaluations were carried out afterward, five days after each application. The fungicide applications were made directly in the field at the time of harvest

químicos: fluazinam (SHOGUN 500<sup>®</sup>, Syngenta) a dosis de 1 L ha<sup>-1</sup>, fenhexamid (ELEVAT<sup>®</sup>, UPL) a 1.5 kg ha<sup>-1</sup>, tiofanato-metil (CERCOBIN M<sup>®</sup>, Basf) a 1 kg ha<sup>-1</sup>, captan (CAPTAN 50 WP<sup>®</sup>, Adama) a 2.5 kg ha<sup>-1</sup>, pyrimethanil (SCALA 400 SC<sup>®</sup>, Bayer CropScience) a 2 L ha<sup>-1</sup>, cyprodinil + fludioxonil (SWITCH<sup>®</sup> 62.5 WG, Syngenta) a 1 kg ha<sup>-1</sup>, boscalid (CANTUS<sup>®</sup>, Basf) a 1 kg ha<sup>-1</sup>, azoxystrobin (IMPALA<sup>®</sup> 25 SC, Adama) a 0.75 L ha<sup>-1</sup>, iprodione (ROVRAL<sup>®</sup> 50 PH, FMC) a 1 kg ha<sup>-1</sup>, además de un testigo (agua destilada estéril), solos y en combinación con silicato de potasio (SUPA SILICA<sup>®</sup>, Agrisolver) a 0.5 L ha<sup>-1</sup>. La parcela donde se realizó el estudio tenía antecedentes de la presencia de moho gris, ya que previamente se colectó y caracterizó morfológica y molecularmente un aislado de *Botrytis cinerea* (número de acceso en el GenBank MG838557) (Terrones *et al.*, 2019). Los fungicidas, solos y en combinación con silicato de potasio, se aplicaron a intervalos de 15 días, iniciando en el mes de octubre (2019) y la segunda repetición el mes de junio (2020) hasta llegar al final de la cosecha en ambos casos, realizando un total de seis aplicaciones en cada repetición, con una aspersora motorizada modelo MS072H (Maruyama<sup>®</sup>) con boquilla de cono hueco y previamente calibrada a un volumen de aplicación 800 L ha<sup>-1</sup>.

Se realizó una evaluación previa a las aplicaciones de los tratamientos, posteriormente se realizaron seis evaluaciones, cinco días después de cada aplicación de tratamientos, estas se realizaron directamente en campo al momento de la cosecha, donde se encontraron síntomas de moho gris con diferentes porcentajes de incidencia y severidad. El porcentaje de incidencia se calculó contabilizando el número de frutos con síntomas de la enfermedad y/o signos del patógeno con relación a 100 frutos elegidos al azar por cada planta evaluada, por unidad experimental (tratamiento). La severidad de la enfermedad se determinó en los mismos frutos

when gray mold symptoms were found with different percentages of incidence and severity. The percentage of incidence was calculated by counting the number of fruits with symptoms of the disease and/or signs of the pathogen among 100 fruits chosen at random for each plant evaluated per experimental unit (treatment). The severity of the disease was determined in the same fruits ( $n=100$ ) using a diagrammatic scale adjusted by Horsfall and Barratt and generated with 2LOG (Osada-Velázquez and Mora-Aguilera, 1997), with the following classes 0=0; 1= 0.1–3.2–7.8; 2= 7.9–25.4–48; 3= 48.1–63.62–83, 4= 83.1–94.58–100. This scale was used to determine the ranges and midpoint of disease severity (Tovar-Soto *et al.*, 2002). The percentages of incidence and severity were converted to area under the disease progress curve values (AUCPE) with the SAS program version 9.3.

Six harvests were carried out (every 15 days, respecting the safety interval for fungicides). The fruits were weighed on an analytical balance (OHAUS®, USA). The total yield was calculated by adding all the harvested fruits from 14 plants in each repetition and extrapolating the yield per hectare later. Total soluble solids (degrees Brix) were determined at each harvest in randomly selected fruits using a digital palette refractometer PR-101 $\alpha$  (ATAGO, Japan). Twenty measurements were made for each repetition, including asymptomatic and symptomatic fruits. The silicon content in the foliage was also evaluated at the end of the experiment by collecting 20 g of foliage from blackberry plants and subjecting the material to wet digestion with perchloric and nitric acid (Alcantar and Sandoval, 1999). The samples obtained from the digestion were analyzed using plasma induction atomic emission spectroscopy (ICP-VARIAN 725-ES).

The experiment was a 10 $\times$ 2 factorial design with 20 treatments, four replications and 80

( $n=100$ ) con el uso de una escala diagramática bajo el principio de Horsfall y Barratt con las clases 0=0; 1= 0.1–3.2–7.8; 2= 7.9–25.4–48; 3= 48.1–63.62–83, 4= 83.1–94.58–100 y generada con 2LOG (Osada-Velázquez y Mora-Aguilera, 1997) para obtener los rangos de severidad y el punto medio (Tovar-Soto *et al.*, 2002). Los porcentajes de incidencia y severidad se transformaron a valores de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) con el programa SAS versión 9.3.

Se realizaron seis cosechas (cada 15 días, respetando el intervalo de seguridad de los fungicidas), los frutos se pesaron en una balanza analítica (OHAUS®, EE. UU.), el rendimiento total se obtuvo mediante la suma de todas las cosechas de 14 plantas establecidas en cada repetición y posteriormente se extrapolo el rendimiento por hectárea. En cada cosecha se determinaron sólidos solubles totales (grados Brix) con un refractómetro digital tipo paleta PR-101 $\alpha$  (ATAGO, Japón) en frutos elegidos al azar. Se realizaron 20 mediciones en cada repetición incluyendo frutos asintomáticos y sintomáticos, también se evaluó el contenido de silicio en el follaje al finalizar el experimento, obteniendo 20 g de follaje de la planta de zarzamora para realizar una digestión húmeda a partir de ácido perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). Las muestras obtenidas a partir de la digestión se analizaron en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-VARIAN 725-ES).

El experimento se condujo bajo un diseño factorial, 10  $\times$  2 con 20 tratamientos, cuatro repeticiones y 80 unidades experimentales, cada una consistió de una parcela de 7 m de largo por 2 m de ancho con 14 plantas de zarzamora distribuidas en hilera. Se realizaron dos repeticiones del experimento, la primera, fue en los meses de octubre a enero (2019-2020) y la segunda repetición en los meses de junio a septiembre (2020). Los datos de las variables se sometieron a análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas e independencia de los datos, así

experimental units, each one consisting of a plot 7 meters long and 2 m wide with 14 blackberry plants distributed along one row. Two repetitions of the experiment were carried out. The first from October to January (2019-2020) and the second one from June to September (2020). The data were subjected to analysis of normality and homogeneity of variances, data independence, analysis of variance and comparison of means (LSD,  $p \leq 0.05$ ). All analyses were carried out using the SAS program version 9.3.

In the evaluation of incidence, an interaction between the factors was identified (G.L.= 9,  $F= 238.09$ ,  $p<0.0001$ ) in the first repetition of the experiment. In addition, there were significant differences ( $F= 540.5$ ,  $p<0.0001$ ) in the AUCPE. The treatment based on azoxystrobin + potassium silicate was significantly different from the rest of the treatments, presenting the lowest AUCPE value (1320), as well as the lowest incidence percentages (Table 1). Interactions between the factors were also identified (G.L. = 9,  $F= 289.04$ ,  $p<0.0001$ ) in the second repetition, as well as significant differences ( $F= 376.27$ ,  $p<0.0001$ ) in the AUCPE. The results showed again that the combination of azoxystrobin + potassium silicate was significantly different from the rest of the treatments, presenting the lowest AUCPE value (1099) and the lowest percentages of incidence of the disease (Table 1; Figure 1).

The evaluation of disease severity showed an interaction between the factors (G.L. = 9,  $F= 434.05$ ,  $p<0.0001$ ), as well as significant differences ( $F= 502.96$ ,  $p<0.0001$ ) in the AUCPE during the first repetition of the experiment. The treatments based on iprodione, iprodione + potassium silicate and azoxystrobin + potassium silicate were significantly different from the rest of the treatments, with AUCPE values of 355.8, 338.2 and 298.5, respectively. These treatments

como un análisis de varianza y comparación de medias (LSD,  $p \leq 0.05$ ), utilizando el programa SAS versión 9.3.

En la evaluación de la incidencia, en la primera repetición del experimento, se identificó interacción entre los factores (G.L.= 9,  $F= 238.09$ ,  $p<0.0001$ ), además hubo diferencias significativas ( $F= 540.5$ ,  $p<0.0001$ ) en el ABCPE. El tratamiento a base de azoxystrobin + silicato de potasio fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, presentando el menor valor de ABCPE (1320), además de presentar los menores porcentajes de incidencia en las evaluaciones realizadas (Cuadro 1). Respecto a la segunda repetición, se identificaron interacciones entre los factores (G.L.= 9,  $F= 289.04$ ,  $p<0.0001$ ) y se observaron diferencias significativas ( $F= 376.27$ ,  $p<0.0001$ ) en el ABCPE, encontrando nuevamente que la combinación de azoxystrobin + silicato de potasio fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, donde se obtuvo el menor valor (1099), así mismo se observaron los menores porcentajes de incidencia de la enfermedad (Cuadro 1; Figura 1).

En cuanto a la evaluación de la severidad, se observó interacción entre los factores (G.L. = 9,  $F= 434.05$ ,  $p<0.0001$ ), así como diferencias significativas ( $F= 502.96$ ,  $p<0.0001$ ) en el ABCPE durante la primera repetición del experimento. Los tratamientos a base de iprodione, iprodione + silicato de potasio y azoxystrobin + silicato de potasio fueron significativamente diferentes al resto de los tratamientos, con valores de ABCPE de 355.8, 338.2 y 298.5, respectivamente. Además, se presentaron los porcentajes más bajos de severidad de la enfermedad (Cuadro 1). En la segunda repetición, hubo interacciones entre los factores (G.L. = 9,  $F= 317.02$ ,  $p<0.0001$ ), además de observarse diferencias significativas ( $F= 373.06$ ,  $p<0.0001$ ) en el ABCPE y las plantas que se trataron con la combinación de azoxystrobin + silicato de potasio

**Table 1. Effect of potassium silicate on the control of blackberry gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* under field conditions during two evaluation cycles.**

**Cuadro 1. Efecto del Silicato de potasio para el control del moho gris en zarzamora causado por *Botrytis cinerea* en condiciones de campo, durante dos ciclos de evaluación**

| Tratamiento          | Primera repetición (octubre de 2019 a enero de 2020) |                    |                 |                     |         |         | Segunda repetición (mayo a agosto de 2020) |                          |                 |                    |                 |                    |         |                   |               |                          |
|----------------------|------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|---------------------|---------|---------|--------------------------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|---------|-------------------|---------------|--------------------------|
|                      | % Incidencia                                         |                    | % severidad     |                     | ° Brix  |         | Conc. Silicio                              | Rendimiento <sup>x</sup> | % Incidencia    |                    | % severidad     |                    | ° Brix  |                   | Conc. Silicio | Rendimiento <sup>x</sup> |
|                      | E7 <sup>z</sup>                                      | ABCPE <sup>y</sup> | E7 <sup>z</sup> | ABCPE <sup>y</sup>  | Sanas   | Enfer.  |                                            |                          | E7 <sup>z</sup> | ABCPE <sup>y</sup> | E7 <sup>z</sup> | ABCPE <sup>y</sup> | Sanas   | Enfer.            |               |                          |
| Fluazinam            | 39                                                   | 5070b <sup>w</sup> | 2.2             | 942.9b              | 8.99jz  | 6.51jkl | 21.11kl                                    | 6.74l                    | 38              | 4770bz             | 1.9             | 834.5b             | 9.01i   | 6.53ghi           | 20.59k        | 6.66m                    |
| Fenhexamid           | 33                                                   | 3968cd             | 1.6             | 669.5e              | 9.14i   | 7.08c   | 20.49l                                     | 7.97k                    | 29              | 3593c              | 1.3             | 594.7e             | 9.14h   | 7.06d             | 21.67k        | 8.12l                    |
| Tiofanato-metil      | 25                                                   | 3188gh             | 1               | 636.5e              | 9.17hi  | 7.07cd  | 21.15kl                                    | 9.43fgh                  | 23              | 2940fg             | 1               | 575.2e             | 9.16gh  | 7.05d             | 21.80k        | 9.35i                    |
| Captan               | 31                                                   | 4110c              | 1.4             | 951.7b              | 9.21fg  | 6.49kl  | 21.86jk                                    | 8.01k                    | 27              | 3585c              | 1.3             | 853.9b             | 9.21fg  | 6.46i             | 23.14ij       | 8.02l                    |
| Pyrimetamil          | 28                                                   | 3739e              | 1.8             | 925.2bc             | 9.19gh  | 6.59hi  | 21.76jk                                    | 8.55ij                   | 25              | 3345de             | 1.3             | 822.8bc            | 9.22fg  | 6.60g             | 22.78j        | 8.65k                    |
| Fludioxonil          | 25                                                   | 3608e              | 1.4             | 798.8d              | 9.20fgh | 6.59hi  | 21.79jk                                    | 8.76i                    | 22              | 3169e              | 1               | 811.3bc            | 9.20fgh | 6.62fg            | 23.10ij       | 8.80j                    |
| Boscalid             | 21                                                   | 3034h              | 0.7             | 517.4g              | 9.24ef  | 7.00d   | 22.91i                                     | 9.61ef                   | 20              | 2629h              | 0.6             | 455.6gh            | 9.29de  | 7.02d             | 23.75i        | 9.91g                    |
| Azoxistrobin         | 29                                                   | 2029j              | 2.4             | 370.3hi             | 9.86b   | 7.45a   | 22.26ij                                    | 11.30c                   | 28              | 1905k              | 2.4             | 329.9ij            | 9.99b   | 7.50 <sup>a</sup> | 23.59ij       | 11.42d                   |
| Iprodiona            | 10                                                   | 1811k              | 0.3             | 355.8i              | 9.84b   | 7.34b   | 23.08i                                     | 11.54c                   | 9               | 1631l              | 0.3             | 315.5j             | 10.01b  | 7.33b             | 24.01i        | 11.91c                   |
| Fluazinam + Si       | 30                                                   | 3908d              | 1.2             | 772.9d              | 9.13i   | 6.70g   | 25.81gh                                    | 8.35j                    | 22              | 3398d              | 0.9             | 688.4d             | 9.19fgh | 6.70f             | 28.02g        | 8.66k                    |
| Fenhexamid + Si      | 23                                                   | 3178gh             | 0.8             | 533.4fg             | 9.24ef  | 6.91e   | 26.32g                                     | 9.48efg                  | 15              | 2779gh             | 0.6             | 488.1fg            | 9.31cd  | 6.97d             | 28.39fg       | 9.85g                    |
| Tiofanato-metil + Si | 20                                                   | 2771i              | 0.6             | 601.1ef             | 9.27de  | 6.77f   | 26.57fg                                    | 10.26d                   | 17              | 2419i              | 0.6             | 537.6ef            | 9.35c   | 6.83e             | 28.97f        | 10.68f                   |
| Captan + Si          | 23                                                   | 3030h              | 1.2             | 846.7cd             | 9.30cd  | 6.64gh  | 27.35f                                     | 9.67ef                   | 18              | 2625h              | 1               | 743.2cd            | 9.33cd  | 6.63fg            | 29.22f        | 9.84g                    |
| Pyrimetamil + Si     | 23                                                   | 3281fg             | 1.4             | 835.3cd             | 9.24ef  | 6.55ijk | 28.70e                                     | 9.30gh                   | 19              | 2846fg             | 1.3             | 723.6d             | 9.33cd  | 6.63fg            | 30.86e        | 9.55h                    |
| Fludioxonil + Si     | 24                                                   | 3364f              | 1.2             | 650.2e              | 9.23efg | 6.46l   | 29.62d                                     | 9.16h                    | 19              | 2963f              | 1.1             | 596.9e             | 9.30cde | 6.48hi            | 31.94d        | 9.60h                    |
| Boscalid + Si        | 22                                                   | 2640i              | 0.7             | 461.6gh             | 9.29cd  | 6.57ij  | 37.84c                                     | 10.27d                   | 16              | 2228j              | 0.5             | 402.9hi            | 9.35cd  | 6.58hg            | 39.96c        | 10.96e                   |
| Azoxistrobin + Si    | 4                                                    | 1320m              | 0.1             | 298.5i              | 10.33a  | 7.09c   | 50.79a                                     | 12.44a                   | 3               | 1099n              | 0.1             | 214.5k             | 10.47a  | 7.17c             | 53.75a        | 13.62a                   |
| Iprodiona + Si       | 10                                                   | 1646l              | 0.3             | 338.2i              | 10.36a  | 7.49a   | 41.44b                                     | 11.98b                   | 6               | 1286m              | 0.2             | 297.6j             | 10.43a  | 7.55 <sup>a</sup> | 43.30b        | 12.80b                   |
| Silicato de potasio  | 25                                                   | 3041h              | 1.1             | 657.1e              | 9.32c   | 5.21m   | 25.03h                                     | 9.72e                    | 20              | 2606h              | 1               | 587.6e             | 9.24ef  | 5.31j             | 26.22h        | 9.83g                    |
| Testigo              | 79                                                   | 7436a              | 41.7            | 3841.4 <sup>a</sup> | 8.75k   | 5.10n   | 19.76m                                     | 3.06m                    | 69              | 6555a              | 31.2            | 2889.3a            | 8.78j   | 4.60k             | 20.27l        | 3.27n                    |

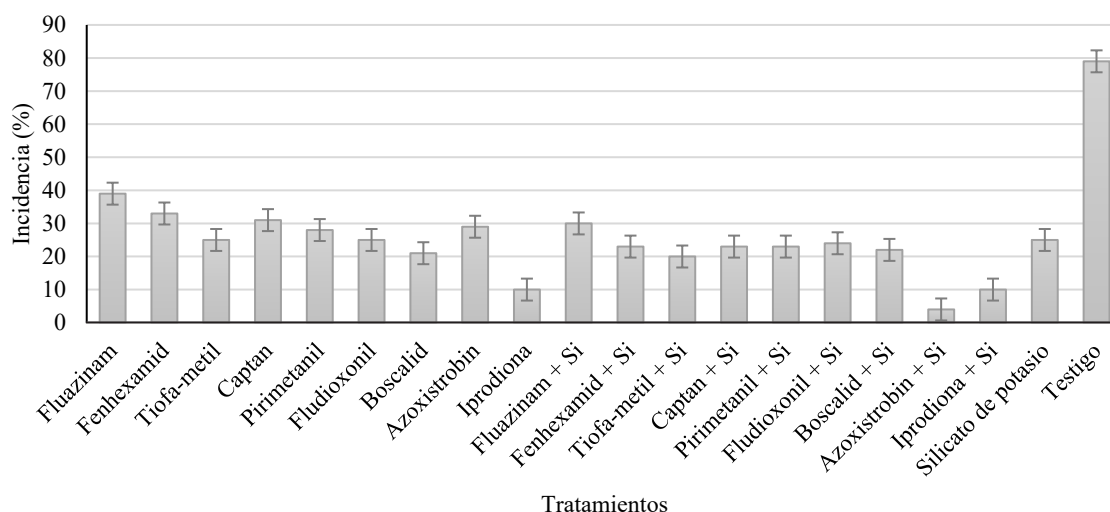
<sup>w</sup>Los valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (\*= p<0.05) según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD). / <sup>w</sup>Mean values followed by the same letters within the same column are statistically equal (\*= p<0.05) according to the least significant difference (LSD) test.

<sup>x</sup>Rendimiento en t ha<sup>-1</sup>. / Yield in t ha<sup>-1</sup>.

<sup>y</sup>Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad calculada con las siete evaluaciones realizadas en el tiempo. / <sup>y</sup>Area Under the Disease Progress Curve calculated with the seven assessments over time.

<sup>z</sup>Porcentaje de la última evaluación realizada. / <sup>z</sup>Percentage of last evaluation performed.





**Figure 1. Incidence of gray mold induced by *B. cinerea* in blackberry fruits sprayed with 20 different treatments in the field. Data from the last evaluation (seventh) of the second repetition of the experiment.**

**Figura 1. Incidencia de moho gris inducido por *B. cinerea* en frutos de zarzamora asperjados con 20 tratamientos en campo. Datos de la última evaluación (séptima) de la segunda repetición del experimento.**

also presented the lowest percentages of disease severity (Table 1). In the second repetition, there were interactions between the factors (G.L = 9, F= 317.02,  $p < 0.0001$ ) as well as significant differences (F= 373.06,  $p < 0.0001$ ) in the AUCPE. The treatment of azoxystrobin + potassium silicate showed significantly different results from the rest of the treatments, with the lowest AUCPE value (214.5) and the lowest percentage of the severity of the disease (Table 1; Figure 2).

With the addition of potassium silicate, all fungicides under study promoted a reduction in the incidence and severity of the disease induced by *B. cinerea*, compared to the application of the fungicides alone. This was reflected in the AUDPC. These results could be because Si modifies the properties of plant cell walls (Iwasaki *et al.*, 2002) by forming a hard outer layer (Bélanger *et al.*, 2003) that significantly reduces the penetration of phytopathogenic fungi (Rodrigues *et al.*, 2015). It has been reported that the foliar application of

fueron significativamente diferentes al resto de los tratamientos, presentando el menor valor (214.5); asimismo mostrando los porcentajes más bajos de severidad de la enfermedad (Cuadro 1; Figura 2).

Con la adición de silicato de potasio, todos los fungicidas promovieron una reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad inducida por *B. cinerea* comparado con las aplicaciones individuales, lo cual se reflejó en el ABCPE. Lo anterior se podría deber a que el Si modifica las propiedades de la pared celular de las plantas (Iwasaki *et al.*, 2002), creando una capa externa dura de la misma (Bélanger *et al.*, 2003) que reduce significativamente la penetración de los hongos fitopatógenos (Rodrigues *et al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado que el Si aplicado en forma foliar, activa las defensas naturales de las plantas, principalmente en la expresión de genes (Fauteux *et al.*, 2005). Con base en los conceptos generales de Jennings (2007) sobre nutrición y crecimiento micelial de hongos, al adherirse el Si a la pared celular, las enzimas de

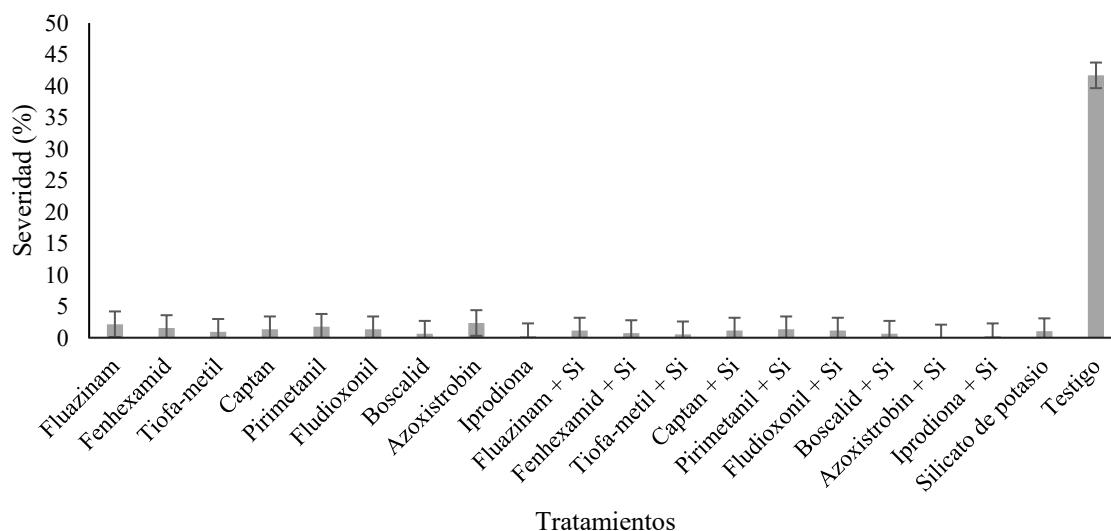


Figure 2. Severity of gray mold disease induced by *B. cinerea* in blackberry fruits sprayed with 20 different treatments in the field. Data from the last evaluation (seventh) of the second repetition of the experiment.

Figura 2. Severidad del moho gris inducido por *B. cinerea* en frutos de zarzamora asperjados con 20 tratamientos en campo. Datos de la última evaluación (séptima) de la segunda repetición del experimento.

Si activates the natural defenses of plants, mainly those associated with gene expression (Fauteux *et al.*, 2005). According to the general concepts of Jennings (2007) on fungal nutrition and mycelial growth, when Si adheres to the cell wall, the enzymes released from the hyphae cannot act efficiently to break down cellulose to glucose, affecting the nutrition of the fungus and mitigating the disease caused by it (Datnoff *et al.*, 2011).

The application of azoxystrobin reduced the percentages of incidence and severity in the first three evaluations (three applications). However, the fourth evaluation showed poorer results in the control of the disease, which suggests that the pathogen possibly developed resistance since strobilurins, as mentioned above, have a high risk of inducing resistance (Villani and Cox, 2014). This was not observed when azoxystrobin was combined with potassium silicate, possibly due to the modifications in the cell walls induced by Si and its ability to activate the plant's natural defenses (Bélanger *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2015).

las hifas no actúan eficientemente en desdoblar la celulosa a glucosa, y la nutrición del hongo es afectada negativamente, por lo que la enfermedad se reduce (Datnoff *et al.*, 2011).

La aplicación de azoxystrobin disminuyó los porcentajes de incidencia y severidad en las primeras tres evaluaciones (tres aplicaciones), sin embargo, a partir de la cuarta se observó que no controlaba de la misma manera, por lo cual se observó que el patógeno posiblemente desarrolló resistencia, ya que las estrobilurinas, como se mencionó anteriormente, presentan alto riesgo de inducir resistencia (Villani y Cox, 2014). Lo anterior no se observó cuando el azoxystrobin se combinó con silicato de potasio y este efecto posiblemente se debe a las propiedades que presenta el Si como alterador de la pared celular y activador de las defensas naturales de la planta (Bélanger *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2015).

En la variable sólidos solubles totales durante la primera repetición del experimento, se identificaron interacciones entre los factores en frutos

During the first repetition of the experiment, the total soluble solids variable showed interactions between factors in diseased (G.L = 9, F= 42.92,  $p<0.0001$ ) and healthy (G.L = 9, F= 97.95,  $p<0.0001$ ) fruits. In addition, significant differences were observed between diseased (F= 611.47,  $p<0.0001$ ) and healthy fruits (F= 711.52,  $p<0.0001$ ). The plants treated with azoxystrobin + potassium silicate and iprodione + potassium silicate showed significantly different results from the rest of the treatments, presenting the highest concentration of soluble solids in diseased and healthy fruits (Table 1). Similarly, in the second repetition of the experiment there was an interaction between factors in diseased (G.L = 9, F= 58.42,  $p<0.0001$ ) and healthy fruits (G.L = 9, F = 104.52,  $p<0.0001$ ). Significant differences were observed in diseased (F = 347.31,  $p<0.0001$ ) and healthy fruits (F = 414.06,  $p<0.0001$ ). The plants treated with azoxystrobin + potassium silicate and iprodione + potassium silicate showed significantly different results from the rest of the treatments with respect to the highest concentration of soluble solids in diseased and healthy fruits (Table 1).

In the present study, the concentration of soluble solids was higher in healthy fruits compared to diseased ones, but the plants treated with azoxystrobin + potassium silicate and iprodione + potassium silicate showed more degrees Brix. Marodin *et al.* (2014) found that the application of Si improved the physicochemical quality of tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) by increasing the content of soluble solids. Similarly, Jarosz (2012) found a higher amount of soluble solids in cucumbers sprayed with Si. The response of plants to Silicon includes changes in the concentration of different elements, biomass production (including yield), photosynthetic rate, transpiration rate and production of enzymatic and non-enzymatic antioxidants, as well as changes in other

enfermos (G.L = 9, F= 42.92,  $p<0.0001$ ) y sanos (G.L = 9, F= 97.95,  $p<0.0001$ ). Además, se observaron diferencias significativas en frutos enfermos (F= 611.47,  $p<0.0001$ ) y en sanos (F= 711.52,  $p<0.0001$ ), donde las plantas que se trataron con azoxystrobin + silicato de potasio e iprodione + silicato de potasio fueron significativamente diferentes al resto de los tratamientos, presentado la mayor concentración de sólidos solubles para frutos enfermos y sanos (Cuadro 1). De manera similar, en la segunda repetición del experimento, hubo interacción entre los factores en frutos enfermos (G.L = 9, F= 58.42,  $p<0.0001$ ) y sanos (G.L = 9, F = 104.52,  $p<0.0001$ ), y se observaron diferencias significativas, tanto para frutos enfermos (F = 347.31,  $p<0.0001$ ) como para sanos (F = 414.06,  $p<0.0001$ ), donde las plantas que se trataron con azoxystrobin + silicato de potasio e iprodione + silicato de potasio fueron significativamente diferentes al resto de los tratamientos al identificarse la mayor concentración de sólidos solubles para frutos enfermos y sanos (Cuadro 1).

La concentración de sólidos solubles en la presente investigación fue mayor en frutos sanos respecto a los enfermos, pero las plantas tratadas con azoxystrobin + silicato de potasio e iprodione + silicato de potasio presentaron mayor cantidad de grados Brix. Por su parte, Marodin *et al.* (2014), encontraron que las aplicaciones de Si mejoraron la calidad fisicoquímica de los frutos de jitomate (*Solanum lycopersicum*), ya que incrementó los contenidos de sólidos solubles. De manera similar, Jarosz (2012) encontró mayor cantidad de sólidos solubles en pepino asperjado con Si. Las respuestas de las plantas al Silicio pueden ser cambios en la concentración de elementos, producción de biomasa (incluido el rendimiento), tasa fotosintética, tasa transpiratoria y producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, además de otros componentes de interés agronómico o comercial, como la

components of agronomic or commercial interest such as the content of soluble solids (Guntzer *et al.*, 2012; Haynes *et al.*, 2013).

Regarding the concentration of Silicon, interactions between factors were identified (G.L = 9, F = 324.27,  $p < 0.0001$ ) in the first repetition of the experiment. Significant differences in the values of this variable were also observed (F = 661.90,  $p < 0.0001$ ). The combination of azoxystrobin + potassium silicate was significantly different from the rest of the treatments, presenting the highest concentration of Silicon (50.79 ppm) (Table 1). A similar result was observed in the second repetition, with interactions between factors (G.L = 9, F = 315.13,  $p < 0.0001$ ) and significant differences between treatments (F = 661.28,  $p < 0.0001$ ). The combination of azoxystrobin + potassium silicate was significantly different from the rest of the treatments, presenting the highest silicon concentration (53.75 ppm) (Table 1).

Regarding fruit yield, an interaction between the factors was identified (G.L = 9, F = 176.61,  $p < 0.0001$ ) during the first repetition, as well as significant differences between treatments (F = 429.24,  $p < 0.0001$ ). The plants treated with azoxystrobin + potassium silicate showed significantly different results from the rest of the treatments. This treatment was associated with the highest yield (12.4 t ha<sup>-1</sup>), followed by the treatments based on iprodione + potassium silicate and iprodione, with yields of 11.9 and 11.5 t ha<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). In the second repetition there was also an interaction between factors (G.L = 9, F = 195.54,  $p < 0.0001$ ) as well as significant differences between treatments (F = 476.31.12,  $p < 0.0001$ ). The treatment of azoxystrobin + potassium silicate was significantly different from the rest of the treatments, presenting the highest yield (13.6 t ha<sup>-1</sup>), even higher than the result of the first repetition (Table 1).

concentración de sólidos solubles (Guntzer *et al.*, 2012; Haynes *et al.*, 2013).

Respecto a la concentración de Silicio, se identificaron interacciones entre los factores (G.L = 9, F = 324.27,  $p < 0.0001$ ) en la primera repetición del experimento, además de identificarse diferencias significativas (F = 661.90,  $p < 0.0001$ ). La combinación de azoxystrobin + silicato de potasio fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, presentando la concentración más alta de Silicio (50.79 ppm) (Cuadro 1). Similarmente ocurrió en la segunda repetición, ya que se identificaron interacciones entre los factores (G.L = 9, F = 315.13,  $p < 0.0001$ ) y diferencias significativas (F = 661.28,  $p < 0.0001$ ), donde la combinación de azoxystrobin + silicato de potasio fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, presentando la concentración de silicio más alta (53.75 ppm) (Cuadro 1).

En la variable rendimiento durante la primera repetición, se identificó interacción entre los factores (G.L = 9, F = 176.61,  $p < 0.0001$ ), así como diferencias significativas (F = 429.24,  $p < 0.0001$ ). Las plantas tratadas con azoxystrobin + silicato de potasio mostraron valores significativamente diferentes al resto de los tratamientos, presentando el mayor rendimiento (12.4 t ha<sup>-1</sup>), seguido de los tratamientos a base de iprodione + silicato de potasio e iprodione, con rendimientos de 11.9 y 11.5 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Cuadro 1). Del mismo modo, en la segunda repetición, hubo interacción entre los factores (G.L = 9, F = 195.54,  $p < 0.0001$ ) y se observaron diferencias significativas (F = 476.31.12,  $p < 0.0001$ ), en el cual, el tratamiento de azoxystrobin + silicato de potasio fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, mostrando el mayor rendimiento (13.6 t ha<sup>-1</sup>) y siendo mayor en comparación con la primera repetición (Cuadro 1).

Las plantas que se trataron con azoxystrobin + silicato de potasio presentaron el mayor rendimien-

The plants treated with azoxystrobin + potassium silicate presented the highest yield per hectare. This is probably because Si alone, as a nutritive element, performs some metabolic and structural functions that have beneficial effects on the physiology of plants. Thus, the accumulation of Si results in an increase in productivity in different plant species. Marodine *et al.* (2014) evaluated the effect of three silicon sources on tomato yield and found that the yield increased as the dose of silicon increased. Lu *et al.* (2016) evaluated three different sources of Silicon on the agronomic variables of tomato and determined that the application of nanosilica was associated with increased height and dry and fresh weight of plant organs, and consequently with increased yield. Numerous studies suggest that Silicon increases the yield of crops such as strawberry (Ouellette *et al.*, 2017), tomato (Lu *et al.*, 2016; Marodine *et al.*, 2014; Toresano *et al.*, 2012), cucumber (Abd- Alkarim *et al.*, 2017), courgette (*Cucurbita pepo*) (Savvas *et al.*, 2009), potato (*Solanum tuberosum*) (Pilon *et al.*, 2013), wheat (*Triticum durum*) (Hanafy *et al.*, 2008), and other grasses (Ahmad *et al.*, 2017).

One of the most notable effects of Silicon on plants is the reduction of the incidence and severity of diseases caused by pathogens, which is reflected in different agronomic characteristics, including yield. Silicon applications can work as well as fungicides to suppress plant diseases, which makes this element a valuable addition to an integrated disease management strategy (Fillinger *et al.*, 2016).

In general, the data obtained in the present study showed that blackberry plants treated with a combination of different fungicides + potassium silicate, especially azoxystrobin, had a lower incidence and severity of gray mold disease. This was reflected in the component variables of yield. The conclusion is that potassium silicate enhances

to por hectárea, esto posiblemente se debe a que el Si por si solo como elemento nutritivo desempeña algunas funciones metabólicas y estructurales dentro de la fisiología de las plantas, y los beneficios de su acumulación resultan con un incremento en la producción de distintas especies vegetales. Marodine *et al.* (2014), evaluaron el efecto de tres fuentes de Silicio sobre el rendimiento de jitomate y encontraron que el rendimiento fue mayor en las dosis más altas de silicio. Similarmente, Lu *et al.* (2016) evaluaron tres fuentes distintas de Silicio sobre variables agronómicas de jitomate y determinaron que la aplicación de nanosilice tiene un mayor impacto en el incremento de altura y en el peso seco y fresco de los órganos, y de manera consecuente del rendimiento. Numerosos estudios sugieren que el Silicio aumenta el rendimiento de cultivos como fresa (Ouellette *et al.*, 2017), jitomate (Lu *et al.*, 2016; Marodine *et al.*, 2014; Toresano *et al.*, 2012), pepino (Abd-Alkarim *et al.*, 2017), calabacín (*Cucurbita pepo*) (Savvas *et al.*, 2009), papa (*Solanum tuberosum*) (Pilon *et al.*, 2013), trigo (*Triticum durum*) (Hanafy *et al.*, 2008) y otras gramíneas (Ahmad *et al.*, 2017).

Uno de los efectos más notables del Silicio en las plantas es la reducción en la incidencia y severidad de las enfermedades causadas por patógenos, lo cual se ve reflejado en las características agronómicas, incluyendo el rendimiento. Las aplicaciones de Silicio pueden funcionar tan bien como los fungicidas para suprimir las enfermedades de las plantas y la aplicación de este elemento tiene valor para su inclusión como una estrategia integrada de manejo de enfermedades (Fillinger *et al.*, 2016).

En general, los datos obtenidos en la presente investigación revelan que las plantas de zarzamora tratadas con la combinación de los diferentes fungicidas + silicato de potasio, especialmente azoxystrobin, presentaron menor incidencia y severidad de moho gris. Esto se reflejó en las variables

the effect of fungicides in field conditions and is a viable alternative for integrated management programs of blackberry gray mold caused by *Botrytis cinerea*.

## LITERATURE CITED

- Abd-alkarim E, Bayoumi Y, Metwally E and Rakha M. 2017. Silicon supplements affect yield and fruit quality of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown in net houses. African Journal of Agricultural Research 12 (31): 2518-2523. <https://doi.org/10.5897/ajar2017.12484>
- Ahmad H, Sajjid M, Hayat S, Ullah R, Ali M, Jamal A, Rahman A, Aman Z and Ali J. 2017. Growth, yield and fruit quality of strawberry (*Fragaria ananasa* Dutch) under different phosphorus levels. Research in Agriculture 2 (2): 19-28. <http://dx.doi.org/10.22158/ra.v2n2p19>
- Alcántar GG and Sandoval VM. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación Especial No. 10. SMCS. Chapingo, México. 150 p
- Aneberries. 2021. Asociación Nacional de Exportadores de Berries A.C. <https://www.aneberries.mx/> (Consulta, febrero 2022).
- Bélanger RR, Benhamou N and Menzies JG. 2003. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Phytopathology 93:402–412. <https://doi.org/10.1094/phyto.2003.93.4.402>
- Calvo-Garrido C, Viñas I, Elmer PA, Usall J and Teixidó N. 2014. Suppression of *Botrytis cinerea* on necrotic grapevine tissues by early season applications of natural products and biocontrol agents. Pest Management Science 70 (4):595–602. <https://doi.org/10.1002/ps.3587>
- Carisse O, Tremblay DM and Lefebvre A. 2015. Comparison of *Botrytis cinerea* airborne inoculum progress curves from raspberry, strawberry and grape plantings. Plant Pathology 63(5):983–993. <https://doi.org/10.1111/ppa.12192>
- Datnoff LE, Snyder GH and Korndörfer GH. 2011. Silicon in Agriculture. Studies in Plant Science, 8. Florida, USA. 403p. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-3420\(01\)80001-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-3420(01)80001-X)
- Fauteux F, Rémus BW and Menzies JG. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters 249:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.034>
- Fernández-Ortuño D, Grabke A, Bryson PK, Amiri A, Peres NA and Schnabel G. 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U.S. states. Plant Disease 98:825-833. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0970-RE>
- Fillinger S and Walker AS. 2016. Chemical Control and Resistance Management of *Botrytis* Diseases. Pp: 189-216. In: Fillinger S and Elad Y (eds.), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. 486p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Guntzer F, Keller C and Meunier JD. 2012. Benefits of plant silicon for crops: a review. Agronomy for Sustainable Development 32:201–213. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0039-8>

componentes del rendimiento, por lo tanto, se concluye que el silicato de potasio potencializa el efecto de los fungicidas en condiciones de campo y se presenta como una alternativa viable para incluirse en los programas de manejo integrado de moho gris de la zarzamora causado por *Botrytis cinerea*.

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

- Hanafy AAH, Harb EM, Higazy MA and Morgan SH. 2008. Effect of silicon and boron foliar applications on wheat plants grown under saline soil conditions. International Journal of Agricultural Research 3:1-26. <https://doi.org/10.3923/ijar.2008.1.26>
- Haynes RJ, Belyaeva ON and Kingston G. 2013. Evaluation of industrial wastes as sources of fertilizer silicon using chemical extractions and plant uptake. Journal of Plant Nutrition Soil Science 176:238–248. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200372>
- Iwasaki K, Maier P, Fecht M and Horts JW. 2002. Effects of silicon supply on apoplastic manganese concentrations in leaves and their relation to manganese tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Plant and Soil 238(2):281–288. <https://doi.org/10.1023/A:1014482911196>
- Jarosz Z. 2012. The effect of silicon application and type of substrate on yield and chemical composition of leaves and fruit of cucumber. Journal of Elementology 5:403-414. <https://doi.org/10.5601/jelem.2013.18.3.05>
- Jennings DH. 2007. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press. New York, USA. 622p. <https://doi.org/10.1007/BF02908824>
- Li XP, Kerrigan J, Chai W and Schnabel G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. Mycologia 104(3):650-658. <https://doi.org/10.3852/11-218>
- Lopes UP, Zambolim L, Costa H, Pereira OL and Finger FL. 2014. Potassium silicate and chitosan application for gray mold management in strawberry during storage. Crop Protection 63:103–106. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.013>
- Lu DMM, De Silva MR, Peralta EK, Fajardo AN and Peralta MM. 2016. Growth and yield of tomato applied with silicon supplements with varying material structures. Philippine e-Journal for Applied Research and Development 6:10-18. <http://pejard.slu.edu.ph/vol.6/2016.03.30.pdf>
- Marodin JC, Resende JT, Morales RG, Silva ML, Galvao AG and Zanin DS. 2014. Yield of tomato fruits in relation to silicon sources and rates. Horticultura Brasileira 32(2): 220-224. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362014000200018>
- Osada VHK and Mora AG. 1997. 2LOG. Programa para desarrollar escalas de severidad por el método de Horsfall y Barratt. Manual del Usuario. Montecillo, Estado de México, Colegio de Postgraduados

- Ouellette S, Coyette MH, Labbé C, Laur J, Gaudreau L, Gosselin A and Belanger RR. 2017. Silicon transporters and effects of silicon amendments in strawberry under high tunnel and field conditions. *Frontiers in Plant Science* 8:949. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00949>
- Pilon C, Soratto RP and Moreno LA. 2013. Effects of soil and foliar application of soluble silicon on mineral nutrition, gas exchange, and growth of potato plants. *Crop Science* 53(4): 1605-1614. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.10.0580>
- Rodrigues AF and Datnoff LE. 2015. *Silicon and Plant Disease*. Springer. Cham Heidelberg New York Dordrecht London. 148 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22930-0>
- SAS Institute. 2002. *SAS User's Guide: Statistics, Version 9.0*. SAS Institute. Cary, NC.
- Savvas D, Giotis D, Chatzieustratiou E, Bakea M and Patakioutas G. 2009. Silicon supply in soilless cultivations of zucchini alleviates stress induced by salinity and powdery mildew infections. *Environmental and Experimental Botany* 65:11–17. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.07.004>
- Terrones SJ, Nieto AD, Nava DC, Téliz OD, García VR, Vallejo PMR and Sánchez GP. 2019. *Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry fruit in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(3):365-382 <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>.
- Toresano SF, Valverde GA and Camacho F. 2012. Effect of the Application of Silicon Hydroxide on Yield and Quality of Cherry Tomato. *Journal of Plant Nutrition* 35(4): 567-590. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.644375>
- Tovar SA, Hernández MM, Cristobal AJ, Romero HR y Mora AG. 2002. Escala logarítmica diagramática de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:103-109. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220117>
- Villani SM and Cox KD. 2014. Heteroplasmy of the cytochrome b gene in *Venturia inaequalis* and its involvement in quantitative and practical resistance to trifloxystrobin. *Phytopathology* 104(9):945–953. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0158-R>.

Parasitic behavior of *Nacobbus aberrans* populations from different geographical origin in tomato plants

Habilidad parasítica de poblaciones de *Nacobbus aberrans* de diferente origen geográfico en plantas de jitomate

Mireya Palacios-Alcántara, Nahum Marban-Mendoza, Calixto Leopoldo Carrillo-Fonseca, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Edo. de México, C.P. 56230. Jesús Alberto Acuña-Soto, Anselmo de Jesús Cabrera-Hidalgo*, TecNM-Instituto Tecnológico Superior de Tlatlauquitepec (ITSTL) Carretera Federal Amozoc-Nautla Km. 122+600, Almoloni, Tlatlauquitepec, Puebla C.P. 73907.

*Corresponding author: anselmo.cabrera@tlatlauquitepec.tecnm.mx

Received: March 13, 2022.

Accepted: April 24, 2022.

Palacios-Alcántara M, Marban-Mendoza N, Carrillo-Fonseca CL, Acuña-Soto JA and Cabrera-Hidalgo ADJ. 2022. Parasitic behavior of *Nacobbus aberrans* populations from different geographical origin in tomato plants. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 284-297.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-2>

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 29, 2022.

Abstract. The parasitic behavior of eight populations of *N. aberrans* from different geographical origin on tomato plants cv Miroma was evaluated. Tomato plants 29 days old were transplanted in pots previously inoculated with 0.5 g of galls from each population of nematode. Inoculated plants and control plants were kept for 45 days in a greenhouse. After transplanting (dat),

Resumen. Se evaluó el comportamiento parasítico de ocho poblaciones de *N. aberrans* de diferente origen geográfico en plantas de jitomate cv. Miroma. Plantas de 29 días de edad se colocaron en macetas previamente inoculadas con 0.5 g de raíces agalladas, de cada población del nematodo, y se mantuvieron en invernadero durante 45 días. Plantas sin inocular fueron incluidas con fines de comparación. Se realizaron tres evaluaciones, a intervalos de 15 días después de la inoculación (ddi), para determinar la penetración e invasión de juveniles en las raíces de las plantas de jitomate. A los 15 ddi, las poblaciones de Romita, Tetela y Chapingo presentaron las mayores tasas de penetración e invasión con 58, 50 y 50 juveniles/g de raíz respectivamente; mientras que a los 30 ddi, la presencia de juveniles en las raíces se redujo significativamente, y solo la población de Silao incrementó su penetración con 66 juveniles/g de raíz. A los 45 ddi, hubo un incremento en la cantidad

three evaluations of penetration and invasion of juveniles were made at 15, 30 and 45 dat. The results showed that at 15 dat, the populations of Romita, Tetela and Chapingo presented the highest penetration and invasion rates with 58, 50 and 50 juveniles/g of root, respectively. At 30 dat, only the Silao population increased its penetration with 66 juveniles/g root, while the rest of the populations showed a significant decrease in their penetration rates. At the end of the experiment, the number of juveniles had increased, causing root swelling in the plants, mainly in those that were inoculated with the populations of Romita (158 juveniles/g of root) and Tetela (102 juveniles/g of root). In conclusion, there are clear differences in the behavior of the populations of *N. aberrans* in terms of fertility, penetration capacity and invasion of the root system in tomato plants, depending on their geographical origin.

Key words: False root-knot nematode, parasitic habit, juveniles, penetration and *Solanum lycopersicum*.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is a widely cultivated vegetable around the world, and its production covers a total surface of 5,030,545 ha, and it is produced in 166 countries, where Asia concentrates over 51% of the global production. In the American continent, more than 23,786,872 t of tomato are produced, with the United States, Mexico and Brazil being the largest producers of tomato. In 2019, Mexico reported a production of 4,271,914 t in an area of 87,917 ha, with Chihuahua (330,371 t), Guanajuato (197,126 t) and Zacatecas (153,349 t) being the states with the highest production (FAOSTAT, 2021; SIAP, 2021).

Plant-parasitic nematodes are a strong limitation in agricultural systems, causing losses in yield of

de juveniles e hinchamientos en las raíces, principalmente con las poblaciones de Romita y Tetela con 158 y 102 juveniles/g de raíz, respectivamente. Existen claras diferencias en el comportamiento de las poblaciones de *N. aberrans* en cuanto a su fecundidad, capacidad de penetración e invasión del sistema radical en plantas de jitomate, en función de su origen geográfico.

Palabras clave: “Falso nematodo del nudo”, habilidad parasítica, juveniles, penetración, *Solanum lycopersicum*.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza ampliamente cultivada en el mundo, destinándose para su cultivo una superficie de 5,030,545 ha, y es producida en 166 países, donde Asia concentra más del 51 % de la producción mundial. En el continente americano, se producen poco más de 23,786,872 t de jitomate, siendo Estados Unidos, México y Brasil los principales productores de esta hortaliza. En el 2019, México reportó una producción de 4,271,914 t en un área sembrada de 87,917 ha, siendo Chihuahua (330,371 t), Guanajuato (197,126 t) y Zacatecas (153,349 t) los estados con mayor producción (FAOSTAT, 2021; SIAP, 2021).

Los fitonematodos representan una fuerte limitante en los sistemas de producción agrícola, ocasionando pérdidas de rendimiento del 8.8 al 14.6% por año en varios cultivos en todo el mundo, lo que en términos monetarios se traduce en aproximadamente \$USD 80 a 173 000 millones (Ahuja y Singh, 2020). *N. aberrans* representa una amenaza en la agricultura mexicana e internacional, debido a que posee una alta capacidad reproductiva, una amplia gama de hospedantes, potencial de pérdidas en rendimiento y amplia distribución geográfica, y al menos 40 países establecieron medidas cuarentenarias para prevenir su ingreso. Estos factores

8.8 to 14.6% every year in several crops around the world, which in economic terms translates to approximately \$USD 80-173,000 million (Ahuja and Singh, 2020). *N. aberrans* is a threat to Mexican and international agriculture, since it has a high reproductive ability, a wide range of hosts, potential for losses in yield and a wide geographic distribution, along with the fact that at least 40 countries have established quarantine measures to prevent its entry. These factors lead *N. aberrans* to be considered as one of the 10 most important nematodes in phytopathology (Jones *et al.*, 2013) and make it an important pathogen, and difficult to manage, since, under favorable environmental conditions, a female can produce 37-833 eggs (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Some studies confirm that the behavior of this nematode is directly influenced by temperature and humidity (Inserra *et al.*, 1985). A study by Martínez-Fuentes *et al.* (2010) indicates that the *N. aberrans* populations in Mexico display variation when parasiting bean plants, and reports that some populations do not affect it, whereas other populations can penetrate it and establish themselves in the roots without being able to reproduce, and those that establish themselves display different degrees of reproduction. The variation in pathogenicity within and among populations is common in plant-parasitic nematodes, and it takes places particularly between populations of different geographic origins and they are the result of genetic selection due to specific environmental factors.

An important aspect in the management of any phytopathological agent is the understanding of aspects related to its biology and interaction with its host. For the case of *N. aberrans*, there is little information related to its biological cycle, stages of survival in the soil and activation factors, pathogenic ability, influence of environmental factors in the eclosion of eggs and behavior of the

hacen que *N. aberrans* este considerado como uno de los 10 nematodos más importantes en fitopatología (Jones *et al.*, 2013) y lo convierten en un patógeno importante y de difícil manejo, ya que, bajo condiciones ambientales favorables, una hembra puede producir de 37-833 huevos (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Algunos estudios confirman que el comportamiento de este nematodo está directamente influenciado por la temperatura y la humedad (Inserra *et al.*, 1985). Un estudio realizado por Martínez-Fuentes *et al.* (2010) indican que las poblaciones de *N. aberrans* presentes en México muestran variación al parasitar plantas de frijol, reportando que algunas poblaciones no lo afectan, otras poblaciones pueden penetrar y establecerse en las raíces sin lograr reproducirse, y aquellas que se establecen, manifiestan diferentes grados de reproducción. La variación de patogenicidad dentro y entre poblaciones es común en los fitonematodos, y ocurre especialmente entre poblaciones de diferente origen geográfico y son el resultado de la selección genética debido a factores ambientales específicos.

Un aspecto importante en el manejo de cualquier agente fitopatológico, es comprender aspectos relacionados a su biología e interacción con su hospedante. Para el caso de *N. aberrans*, existe poca información relacionada con su ciclo biológico, estadios de sobrevivencia en el suelo y factores de activación, capacidad patogénica, influencia de los factores ambientales en la eclosión de huevos y comportamiento de los juveniles, entre otros, es por ello, que el objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento patológico de poblaciones de *N. aberrans* de diferente origen geográfico en plantas de jitomate cv Miroma.

Material biológico. Se recolectaron muestras edáficas y vegetales (raíces agalladas) de diferentes regiones agrícolas de Puebla (Tetela de Ocampo y

juveniles, among others. For this reason, the aim of the present study was to evaluate the pathological behavior of *N. aberrans* populations from different geographic origins in tomato cv Miroma plants.

Biological material. Edaphic and plant (galled root) samples were collected from different agricultural regions of Puebla (Tetela de Ocampo and Libres), Guanajuato (Silao and Romita), Michoacán (Tanhuato and Yurécuaro), Nayarit (Compostela) and the State of Mexico (Chapingo). They were kept in greenhouses (28 ± 3 °C, with 13 hours of light and $\pm 40\%$ relative humidity, on average) for the conservation and increase in nematode populations. All populations were previously identified as *N. aberrans* by sequencing ribosomal genes (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015).

Parasitism of *N. aberrans* in tomato plants cv Miroma. Eight *N. aberrans* populations, named after their place of origin (Tetela de Ocampo-TE ($19^{\circ}48'40''$ N, $97^{\circ}48'53''$ O), Libres-Li ($19^{\circ}28'51''$ N, $97^{\circ}39'19''$ O), Silao-Si ($20^{\circ}56'09''$ N, $101^{\circ}26'09''$ O), Romita-RO ($20^{\circ}52'25''$ N, $101^{\circ}32'42.1''$ O), Tanhuato-Ta ($20^{\circ}18'48.4''$ N, $102^{\circ}20'40.3''$ O), Yurécuaro-Yu ($20^{\circ}18'43.7''$ N, $102^{\circ}15'47.9''$ O), Compostela-Co ($21^{\circ}14'37''$ N, $104^{\circ}53'10''$ O) and Chapingo-Cha ($19^{\circ}29'25''$ N, $98^{\circ}52'23''$ O) were inoculated in tomato cv Miroma plants, placing 0.5 g of small, galled root sections of each nematode population in plastic pots with a substrate mixture composed of tezontle + peat moss (1:1). Eight days after inoculation (dai), a tomato cv Miroma plant, aged 29 days, was transplanted into every pot. The inoculated pots were distributed under a completely randomized design with four repetitions and kept in the greenhouse for 45 days. Non-inoculated plants were included to discard the presence of galling plant-parasitic nematodes in the substrate and anatomically compare the growth

Libres), Guanajuato (Silao y Romita), Michoacán (Tanhuato y Yurécuaro), Nayarit (Compostela) y Estado de México (Chapingo). Se mantuvieron en invernadero (28 ± 3 °C, con 13 horas de luz y ± 40 % de humedad relativa en promedio) para la conservación e incremento de las poblaciones del nematodo. Todas las poblaciones fueron identificadas previamente como *N. aberrans*, mediante la secuenciación de genes ribosomales (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015).

Parasitismo de *N. aberrans* en plantas de jitomate cv Miroma. Ocho poblaciones de *N. aberrans* denominadas por su lugar de procedencia (Tetela de Ocampo-TE ($19^{\circ}48'40''$ N, $97^{\circ}48'53''$ O), Libres-Li ($19^{\circ}28'51''$ N, $97^{\circ}39'19''$ O), Silao-Si ($20^{\circ}56'09''$ N, $101^{\circ}26'09''$ O), Romita-RO ($20^{\circ}52'25''$ N, $101^{\circ}32'42.1''$ O), Tanhuato-Ta ($20^{\circ}18'48.4''$ N, $102^{\circ}20'40.3''$ O), Yurécuaro-Yu ($20^{\circ}18'43.7''$ N, $102^{\circ}15'47.9''$ O), Compostela-Co ($21^{\circ}14'37''$ N, $104^{\circ}53'10''$ O) y Chapingo-Cha ($19^{\circ}29'25''$ N, $98^{\circ}52'23''$ O) se inocularon en plantas de jitomate cv Miroma, colocando 0.5 g de pequeñas secciones de raíces agalladas de cada población del nematodo, en macetas de plástico que contenían una mezcla de sustrato compuesta por tezontle + peat moos (1:1). Ocho días después de la inoculación (ddi), se trasplantó una planta de jitomate cv Miroma de 29 días de edad en cada maceta. Las macetas inoculadas se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones y se mantuvieron en invernadero durante 45 días. Plantas sin inocular fueron incluidas para descartar la presencia de fitonematodos agalladores en el sustrato y comparar anatómicamente el crecimiento y desarrollo de las raíces durante el experimento. Las plantas se regaron diariamente por goteo y se fertilizaron vía edáfica con una solución nutritiva cada ocho días (N-P-K: 8-24-0). El experimento se estableció en dos momentos diferentes y los resul-

and development of roots during the experiment. The plants were irrigated every day with drip irrigation and they were fertilized edaphically with a nutrient solution every eight days (N-P-K: 8-24-0). The experiment was established in two different moments and the results were the average of both repetitions. The number of juveniles in the radical system of the tomato plants was quantified 15, 30 and 45 days after transplanting (dat), by staining the roots with acid fuchsine, following the protocol by Byrd *et al.* (1983) with some modifications. This procedure helps us observe nematodes, after staining, in a bright red color, in contrast to the roots, which are transparent or translucent. The specimens inside the tomato roots stained with acid fuchsine were counted along and the number of eggs/females under an Olympus® model CX31 compound microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

The data obtained in the study underwent an analysis of variance and a means comparison test (LSD, $\alpha = 0.05$). All analyses were performed using the statistical program SAS (Statistical Analysis System) version 9.3.

Response of the parasitism of *N. aberrans* in tomato plants. The number of juveniles found inside the roots of the tomato cv Miroma plants displayed significant differences in the three evaluation times ($\alpha = 0.05$) (Table 1). Fifteen dat, the populations of Romita, Tetela and Chapingo presented the highest rates of penetration and invasion in the tomato roots with a total of 58, 50 and 50 juveniles/g of root, respectively (Table 1). It is possible that the speed at which these populations penetrate and invade the root system of the plant give them a competitive advantage against other organism populations, including other species of nematodes, since this may favor, to a higher or lesser degree, their successful establishment and survival, and guarantee a quick source of food.

tados fueron el promedio de ambas repeticiones. Se cuantificó el número de juveniles dentro del sistema radical de las plantas de jitomate a los 15, 30 y 45 días después del transplante (ddt), mediante la tinción de raíces con fucsina ácida, siguiendo el protocolo de Byrd *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Este procedimiento permite observar los nematodos, después del desteñido, de un color rojo brillante en contraste con las raíces que muestran un color trasparente o translucido. Se contaron los especímenes en el interior de las raíces de jitomate teñidas con fucsina ácida y el número de huevos/hembra bajo un microscopio compuesto marca Olympus® modelo CX31 (Olympus, Tokio, Japón). Los datos obtenidos en el estudio se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha = 0.05$). Todos los análisis se hicieron con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.3.

Respuesta del parasitismo de *N. aberrans* en plantas de jitomate. El número de juveniles encontrados en el interior de las raíces de las plantas de jitomate cv Miroma mostró diferencias significativas en los tres tiempos de evaluación ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 1). A los 15 ddt, las poblaciones de Romita, Tetela y Chapingo presentaron las mayores tasas de penetración e invasión en las raíces de jitomate con un total de 58, 50 y 50 juveniles/g de raíz, respectivamente (Cuadro 1). Es posible que la rapidez con la que estas poblaciones penetran e invaden el sistema radicular de las plantas, les confiera una ventaja competitiva contra otras poblaciones de organismos, incluidos otras especies de nematodos, ya que esto puede favorecer, en menor o mayor grado, su exitoso establecimiento y supervivencia, y garantizar una rápida fuente de alimentación. Como lo reportó Umesh (1994), al investigar la competencia entre *Pratylenchus neglectus* y *Meloidogyne chitwoodi* en plantas de cebada, encontró que

Table 1. Total penetration and juveniles average of *N. aberrans* in tomato roots cv Miroma at 15, 30 and 45 dat.**Cuadro 1. Penetración total y promedio de juveniles de *N. aberrans* en raíces de jitomate cv Miroma a los 15, 30 y 45 ddt.**

| Población | Juveniles/gramo de raíz | | | | | | | | |
|------------|-------------------------|-------------|-----------------|--------|-----------|----|--------|-----------|----|
| | 15 ddt | | | 30 ddt | | | 45 ddt | | |
| | Total | \bar{x}^y | NS ^z | Total | \bar{x} | NS | Total | \bar{x} | NS |
| TETELA | 50.00 | 16.67 | AB | 18.00 | 6.00 | B | 102 | 34.00 | B |
| TANHUATO | 30.00 | 10.00 | AB | 0.00 | 0.00 | B | 38 | 12.67 | C |
| LIBRES | 36.00 | 12.00 | AB | 6.00 | 2.00 | B | 24 | 8.00 | C |
| ROMITA | 58.00 | 19.33 | A | 1.50 | 0.50 | B | 158 | 52.67 | A |
| YURECUARO | 6.00 | 2.00 | B | 0.00 | 0.00 | B | 6 | 2.00 | C |
| COMPOSTELA | 6.00 | 2.00 | B | 6.00 | 2.00 | B | 42 | 14.00 | C |
| SILAO | 6.00 | 2.00 | B | 66.00 | 22.00 | A | 18 | 6.00 | C |
| CHAPINGO | 50.00 | 16.67 | AB | 8.00 | 2.67 | B | 16 | 5.33 | C |
| CONTROL | 0.00 | 0.00 | B | 0.00 | 0.00 | B | 0 | 0.00 | C |
| LSD | | 16.83 | | | 13.28 | | | 15.78 | |

^y Number of juveniles/g of galls (average of three repetitions). dat= Days after transplanting. LS= Level of Significance. LSD= Least Significant Difference. / ^y Número de juveniles/g de agallas (promedio de tres repeticiones). ddt= Días después del transplante. NS= Nivel de Significancia. LSD= Diferencia Mínima significativa.

^z Means with the same letter in the same column are not statistically different ($\alpha=0.05$). / ^z Medias con la misma letra en la misma columna, no son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Reports by Umesh (1994) when investigating the competition between *Pratylenchus neglectus* and *Meloidogyne chitwoodi* in barley plants claim that the species that first parasites the roots prevented the penetration and development of the other. Fernández and Ortega (1982) explain that this effect could be due to the damage caused in the tissues by the genus that first invades the host.

The penetration of the juveniles (J2) occurred mainly in the area of elongation of the root (Figure 1A), where, according to Perry (1997), the cells of the apical meristem prepare for their cellular differentiation. The sites of penetration of the juveniles could be easily identified by the presence of necrotic lesions along the cortical parenchyma (Figure 1A-C, red arrows) as a result of the inter and intracellular migration carried out by the nematode, including the vascular cylinder (Figure 1B) (Souza and Baldwin, 2000).

la especie que parasita primero las raíces impidió la penetración y desarrollo de la otra. Fernández y Ortega (1982) explican que este efecto podría deberse al daño que causa en los tejidos el género que invade en primera instancia al hospedante.

La penetración de los juveniles (J2) ocurrió principalmente por la zona de elongación de la raíz (Figura 1A), donde de acuerdo con Perry (1997) las células del meristemo apical se preparan para su diferenciación celular. Los sitios de penetración de los juveniles se pudieron identificar fácilmente por la presencia de lesiones necróticas a lo largo del parénquima cortical (Figura 1A-C, flechas rojas), como resultado de la migración inter e intracelular que realiza el nematodo, incluyendo al cilindro vascular (Figura 1B) (Souza y Baldwin, 2000).

Se encontraron J3 y J4 aislados rodeados de tejido necrótico en la corteza radical (Figura 1D, flecha roja) y de acuerdo con Manzanilla-López *et*

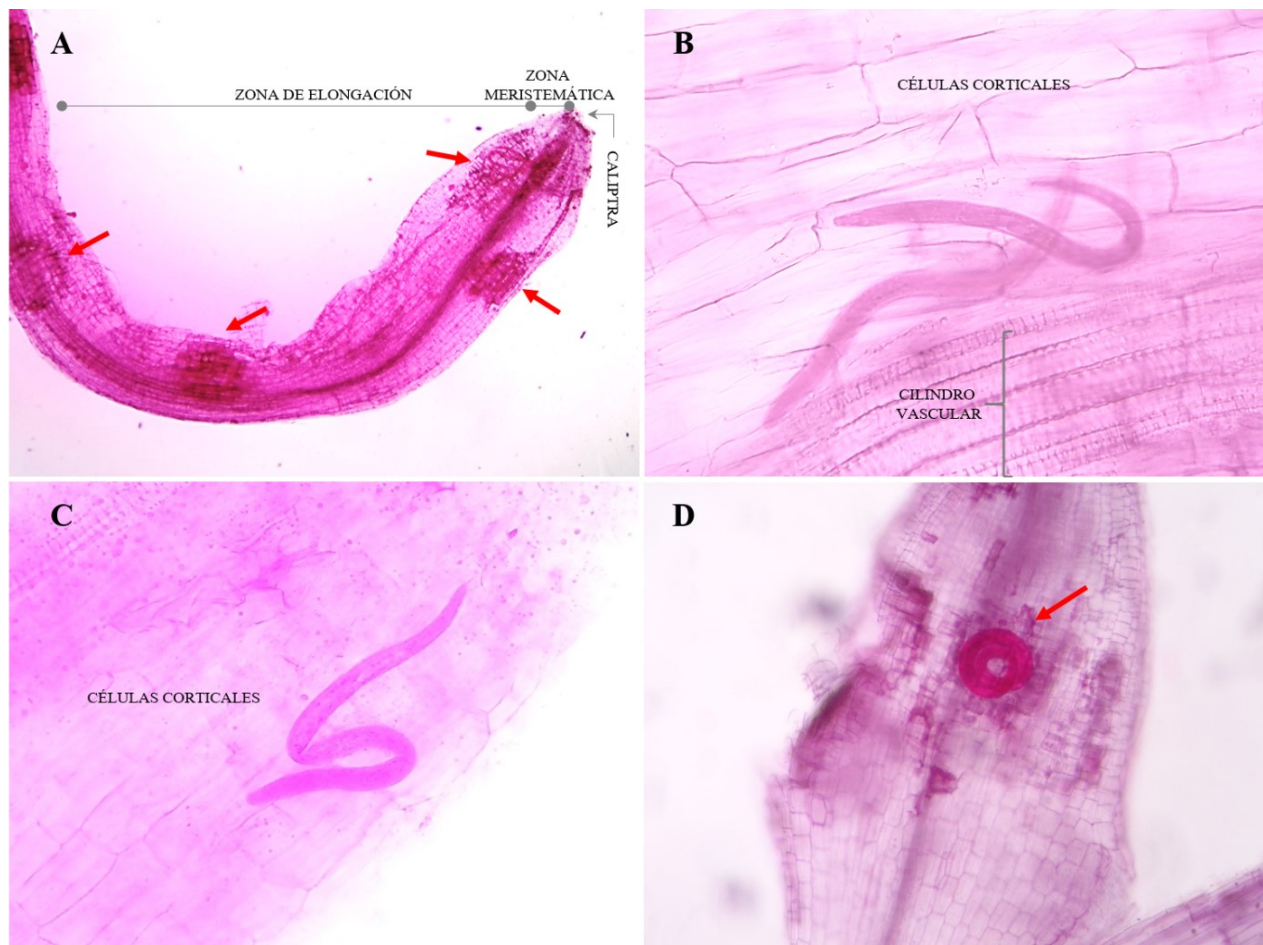


Figure 1. Invasion and penetration of juveniles of *N. aberrans* in tomato roots cv Miroma at 15 dat. A) Necrotic lesions caused by intra and intercellular movement of the nematode (red arrows). B-C) Juveniles inside cortical cells of the root. D) J3 with C-shaped body in the cortical parenchyma of the root (red arrow).

Figura 1. Penetración e invasión de juveniles de *N. aberrans* en las raíces de jitomate cv Miroma a los 15 ddt. A) Lesiones necróticas causadas por el movimiento intra e intercelular del nematodo (flechas rojas). B-C) Juveniles en el interior de las células corticales de la raíz. D) J3 en forma de C en el parénquima cortical de la raíz (flecha roja).

J3 and J4 were found isolated, surrounded by necrotic tissue in the radical cortex (Figure 1D, red arrow) and according Manzanilla-López *et al.* (2002), this is possible because el J2 can change in the root or in the soil to J3, which is less active and tends to remain rolled up in the root cortex (body in a “C” shape).

Thirty dat, a change in the behavior of the nematode populations was observed, since the presence of juveniles in the roots had, in general

al. (2002), esto es posible ya que el J2 puede mudar en la raíz o en el suelo a J3, el cual es menos activo y tiende a permanecer enrollado en la corteza de la raíz (cuerpo en forma de “C”).

A los 30 ddt, se observó un cambio en el comportamiento de las poblaciones del nematodo, ya que la presencia de juveniles en las raíces, de manera general, se redujo significativamente ($\alpha=0.05$). Esto pudo deberse al agotamiento de los juveniles inoculados en el suelo por la rápida penetración ini-

terms, reduced significantly ($\alpha=0.05$). This may be due to the exhaustion of the juveniles inoculated in the soil by the quick initial penetration (15 dat) of these in the roots of the host or by factors of intra and interspecific competition (predation or parasitism) and adaptation (limiting environmental conditions), since nematodes are a group of highly diverse organisms that display a variety of adaptations to extreme soil and plant environments (McSorley, 2003).

The only population to increase its penetration was the one from Silao, with 66 juveniles/g of root, whereas in the rest of the populations, penetration did not exceed 18 juveniles/g of root (Table 1), possibly as a result of partially or totally overcoming the stage of temporary inactivation conditioned by some type of environmental stress or a factor inherent to the biology of the nematode, since according to Evans and Perry (2009), the diapause that takes place in nematodes is not necessarily the result of adverse environmental conditions, nor does it end with favorable conditions, because this is a critical survival mechanism during colder seasons and in the absence of a susceptible host. They add that the latency of the development seems to take place mainly in the egg stage and in the juvenile stages inside the eggs, although cases of diapause are also known to occur in late juvenile stages or in adults, mostly in a few zooparasite nematodes.

In the examined roots, it was common to find juveniles rolled up or in a "C" shape (Figure 2A-D, red arrows) and bulges and swellings were found with necrotic areas (Figure 2C-D), indicating the presence of the nematode inside them, and the formation of the specialized feeding site (syncytium), since according to Prasad and Webster (1967) and Manzanilla-López *et al.* (2002), this leads to a series of histological and physiological alterations in the area of the radical system of the host, induced by the presence of immature females,

cial (15 ddt) de estos en las raíces del hospedante o por factores de competencia intra e interespecífica (depredación o parasitismo) y adaptación (condiciones ambientales limitantes); ya que los nematodos son un grupo de organismos sumamente diverso que muestra una variedad de adaptaciones a los ambientes extremos de suelo y plantas (McSorley, 2003).

La única población que incrementó su penetración fue la de Silao, con 66 juveniles/g de raíz; mientras que, en el resto de las poblaciones la penetración no superó los 18 juveniles/g de raíz (Cuadro 1), posiblemente como resultado de superar parcial o totalmente la etapa de inactivación temporal condicionada por algún estrés ambiental o algún factor inherente a la biología del nematodo. Ya que de acuerdo con Evans y Perry (2009) la diapausa que ocurre en nematodos, no necesariamente es el resultado de condiciones ambientales adversas ni termina con condiciones favorables, esto por tratarse de un mecanismo crítico de supervivencia durante las estaciones frías y en ausencia de un hospedante susceptible. Añaden que la latencia del desarrollo parece ocurrir, principalmente, en la etapa de huevo y en las etapas juveniles dentro de los huevos, aunque también se conocen casos de diapausa en las etapas juveniles tardías o en adultos, principalmente en unos pocos nematodos zooparásitos.

En las raíces examinadas fue común encontrar juveniles enrollados o adoptando una forma de "C" (Figura 2A-D, flechas rojas) y se observaron abultamientos e hinchamientos con áreas necróticas (Figura 2C-D), indicando la presencia del nematodo en su interior y la formación del sitio especializado de alimentación (sincito), ya que de acuerdo con Prasad y Webster (1967) y Manzanilla-López *et al.* (2002), esto da lugar a una serie de alteraciones histológicas y fisiológicas en esa zona del sistema radical del hospedante, inducido por la presencia de hembras inmaduras, normalmente fijadas en la proximidad del cilindro central (Figura 2C-D).



Figure 2. Invasion and penetration of juveniles of *N. aberrans* in tomato roots cv Miroma at 30 dat. A-D) Juveniles with C-shaped body inside the cortical cells (red arrows). C-D) Juveniles surrounding the vascular cylinder. Notice the swelling associated with the presence of juveniles.

Figura 2. Penetración e invasión de juveniles de *N. aberrans* en las raíces de jitomate cv Miroma a los 30 ddt. A-D) Juveniles en forma de “C” en el interior de las células corticales (flechas rojas). C-D) Juveniles alrededor del cilindro vascular. Nótese la presencia de abultamientos asociados con la presencia de los juveniles.

normally fixated in the proximity of the central cylinder (Figure 2C-D).

At 45 dat, an increase in the number of juveniles and radical galling was observed in the tomato plants, mainly with the populations of Romita and Tetela, finding 158 and 102 juveniles/gram of root, respectively (Table 1, Figure 3A-B). These populations displayed constant flows of penetration (Figure 4) as a result of a better adaptation to the particular soil and environmental

A los 45 ddt, se observó un aumento en la cantidad de juveniles y agallamiento radical en las plantas de jitomate, principalmente con las poblaciones de Romita y Tetela, encontrándose 158 y 102 juveniles/gramo de raíz, respectivamente (Cuadro 1, Figura 3A-B). Estas poblaciones mostraron flujos de penetración constante (Figura 4) como resultado de una mejor adaptación a las condiciones particulares del suelo y ambiente; inicialmente, es posible que los huevos presentes en los fragmentos de raíces

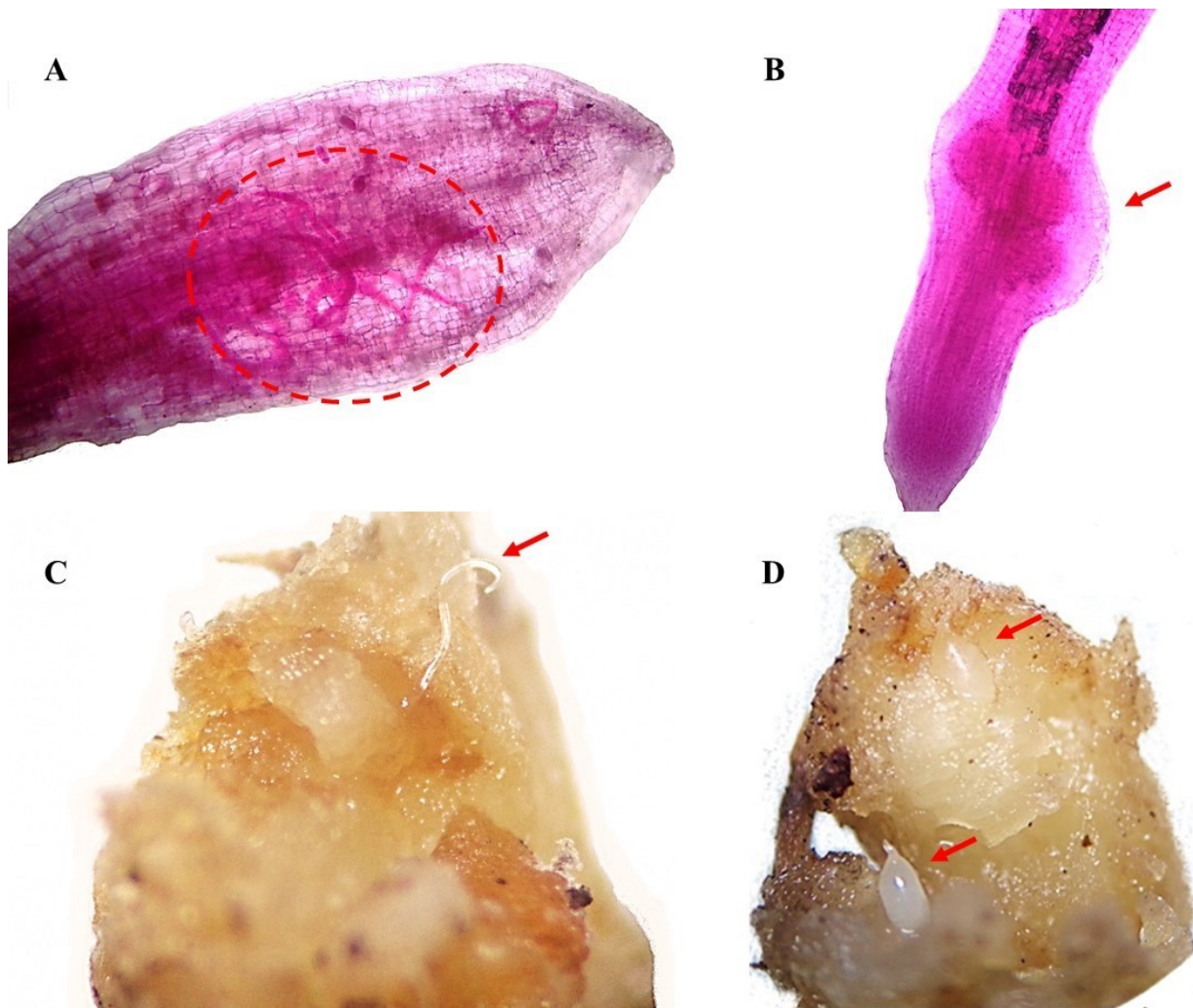


Figure 3. Invasion and penetration of juveniles of *N. aberrans* in tomato roots cv Miroma at 45 dat. A) Clustering of nematodes in the cortical cells and vascular cylinder of tomato roots (red circle). B) Swelling and root necrosis (red arrow). C) Adult male in galls (red arrow). D) Adult females in galls (red arrows).

Figura 3. Penetración e invasión de juveniles de *N. aberrans* en raíces de jitomate cv Miroma a los 45 ddt. A) Aglomeración de nematodos en las células corticales y cilindro vascular de las raíces de jitomate (círculo rojo). B) Abultamiento y necrosamiento radical (flecha roja). C) Presencia de macho adulto en agalla (flecha roja). D) Hembras adultas en agalla (flechas rojas).

conditions. Initially, it is possible that the eggs found in the fragments of inoculated root in both populations responded favorably to the stimuli for their eclosion and finalization of some internal latency condition (diapause) or to some type of environmental stress (quiescence) such as temperature (Van Gundy, 1985) or the presence

inoculadas de estas dos poblaciones respondieron favorablemente a los estímulos para su eclosión y finalización de alguna condición de latencia interna (diapausa) o por algún estrés ambiental (quiescencia) como la temperatura (Van Gundy, 1985) o la presencia del hospedante o lixiviados radicales (Huang y Pereira, 1994; Sikora y Noel, 1996).

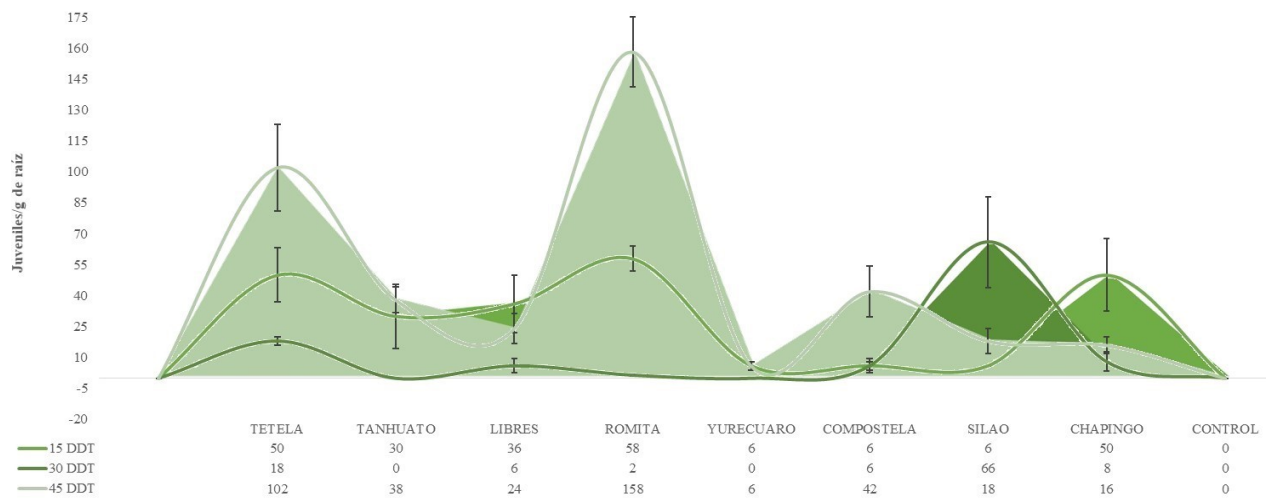


Figure 4. Penetration flows of *N. aberrans* populations at 15, 30 and 45 ddt. Bars indicate standard deviation.
Figura 4. Flujos de penetración de las poblaciones de *N. aberrans* a los 15, 30 y 45 ddt. Las barras indican la desviación estándar.

of the host or radical leachate (Huang and Pereira, 1994; Sikora and Noel, 1996). On the other hand, this could be due to these populations having found optimal conditions for their development, in such a way that allowed them to quickly complete their biological cycle (egg to egg) in comparison with the rest of the populations, leading to the production of overlapping populations.

It is possible that the low penetration of the juveniles of the populations from Yurécuaro and Compostela registered in this study are due to problems in the biological adaptation to the prevailing edaphic conditions, which may have affected their orientation, mobility and penetration abilities in the host, and the greater time it remained in the soil may have led it to experience some type of latency, since according to McSorley (2003), the soil surroundings provide nematodes with diverse degrees of protection against dehydration, although they run the risk of increasing the loss in body water as soils become drier, and this seriously affects their parasitic behavior.

Por otro lado, podría ser porque estas poblaciones encontraron las condiciones óptimas para su desarrollo, de tal modo que les permitió rápidamente completar su ciclo biológico (huevo a huevo) en comparación con el resto de las poblaciones llegando a producir generaciones superpuestas.

Es posible que la baja penetración de los juveniles, de las poblaciones provenientes de Yurécuaro y Compostela, registrada en este estudio, se deba a problemas de adaptación biológica a las condiciones edáficas prevalecientes, lo que pudo afectar su capacidad de orientación, movilidad y penetración en el hospedante, y al estar por mayor tiempo en el suelo pudieron experimentar algún tipo de latencia, ya que de acuerdo con McSorley (2003), el entorno del suelo ofrece diversos grados de protección a los nematodos contra la deshidratación, pero corren el riesgo de aumentar la pérdida de agua corporal a medida que los suelos se secan, y esto afectara seriamente su comportamiento parasítico.

Otra razón que explica la baja penetración de estas poblaciones, podría ser porque las etapas

Another reason that explains the low penetration of these populations may be that the biological stages (eggs and juveniles) were in a latency phase (diapause or quiescence) during inoculation and that a lack of favorable conditions for their development kept them in this way for longer. It is known that the stimulation of the eclosion of eggs in plant-parasitic nematodes is quite complex. For example, in some species of galling (*Meloidogyne* sp.) and cyst nematodes (*Heterodera* sp., *Globodera* sp.), a portion of the eggs hatching quickly, whereas others hatching slowly in time (Zheng and Ferris, 1991; Huang and Pereira, 1994), and the latter could have occurred in the Yurécuaro and Compostela populations.

All the populations, to a higher or lesser degree, managed to penetrate and invade the root system of the tomato plant, confirming the viability of the eggs and biological stages of the nematode. Differences in the rates of penetration and invasion based on the populational geographic origin of the nematodes were clearly observed, with the populations of Romita and Tetela being the most aggressive and best adapted, displaying several peaks of penetration (Figure 4). When fragments of galled roots are used as a source of inoculants, it is common to find all the biological stages of the nematode inside them, from masses of eggs in gelatinous matrices to mature and immature females, and uncommonly, adult males (Figure 3C), which have a certain degree of protection to edaphic factors (temperature, humidity, predators, parasites, etc.) when inside the roots. Once favorable conditions for their development are presented (whether environmental or the presence of a food source), they successfully infect their host, in comparison to those nematodes that only remain in associations with soil particles (Cristóbal-Alejo *et al.* 2001). According to McSorley (2003), the nematodes found in the roots of plants enjoy

biológicas (huevos y juveniles) se encontraban en una fase de latencia (diapausa o quiescencia) al momento de la inoculación y que al no contar con las condiciones favorables para su desarrollo se mantuvieron así por mayor tiempo. Se sabe que la estimulación de la eclosión de huevos en fitonemátodos es bastante compleja, por ejemplo, en algunas especies de nematodos agalladores (*Meloidogyne* sp.) y enquistadores (*Heterodera* sp., *Globodera* sp.), una porción de los huevos eclosiona rápidamente, mientras que otros eclosionan lentamente a través del tiempo (Zheng y Ferris, 1991; Huang y Pereira, 1994), y esto último pudo ocurrir en las poblaciones de Yurécuaro y Compostela.

Todas las poblaciones, en menor o mayor grado, lograron la penetración e invasión del sistema radical de las plantas de jitomate, confirmando la viabilidad de los huevos y estadios biológicos del nematodo. Se observó claramente diferencias en las tasas de penetración e invasión en función al origen geográfico poblacional del nematodo, siendo las poblaciones de Romita y Tetela más agresivas y mejor adaptadas al mostrar varios picos de penetración (Figura 4). Cuando se usan fragmentos de raíces agalladas como fuente de inóculo, es común encontrar en su interior todos los estadios biológicos del nematodo, desde masas de huevos en matriz gelatinosa hasta hembras inmaduras y maduras, y rara vez machos adultos (Figura 3C), que al estar en el interior de las raíces tienen cierto grado de protección a los factores edáficos (temperatura, humedad, depredadores, parásitos, etc.). Una vez que se presentan las condiciones favorables para su desarrollo (ambientales o presencia de una fuente de alimentación), infectan exitosamente a su hospedante, en comparación con aquellos nematodos que sólo permanecen asociados con las partículas del suelo (Cristóbal-Alejo *et al.* 2001). De acuerdo con McSorley (2003), los nematodos que se encuentran dentro de las raíces de las plantas disfrutaban de una

an optimum humidity and protection against desiccation, so long as the host—in this case, the fragments of inoculated galls—remains viable.

On the other hand, in the masses of eggs in the galls that were extracted, 1-2 females were found per gall (Figure 3D), similar to reports by Manzanilla-López *et al.* (2002). The adult female in the galls had a saccular-shaped midsection of the body, a rounded tail, a short neck and a rounded posterior section; these characteristics coincide with descriptions by Manzanilla-López *et al.* (2002) for *N. aberrans*. Several males were found around the egg masses (Figure 3C; data not registered). Manzanilla-López (1997) mentioned that up to 16 males have been found around the galls containing unfertilized females in tomato roots. This occurs because they are attracted by the gelatinous mass; they can be found in the egg mass (1 to 18) or inside the gall, beside the tail of the female.

Based on the results of this study, we can conclude that plant-parasitic nematodes in all biological stages were found (eggs, J2-J4, males, immature and mature females) in the different times evaluated (15, 30 and 45 dat). In addition, the populations of Romita and Tetela displayed the highest parasitic ability over the roots of tomato cv Miroma, presenting continuous flows of penetration and invasion in the plant root systems. Finally, there are clear differences in the behaviors of the populations of *N. aberrans* in terms of their fertility, ability of penetration and invasion of the radical system in tomato plants, depending on their geographic origin.

LITERATURE CITED

- Ahuja A and Singh SV. 2020. Diagnosis of plant-parasitic nematodes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A review. *Crop Protection* 147: pp. 105459 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105459>
- Byrd DW Jr, Kirkpatrick T y Barker KR. 1983. An improved technique for clearing and staining tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15(1): 142-143.

óptima humedad y protección contra la desecación, mientras el hospedante se mantenga viable, en este caso los fragmentos de agallas inoculadas.

Por otro lado, las masas de huevos en las agallas que fueron extraídas, se encontraron de 1-2 hembras por agalla (Figura 3D), similar a lo reportado por Manzanilla-López *et al.* (2002). La hembra adulta presente en las agallas tenía el cuerpo en forma sacular en su parte media, cola redondeada, cuello corto y región posterior redondeada, estas características coinciden con las descripciones hechas por Manzanilla-López *et al.* (2002) para *N. aberrans*. Varios machos fueron encontrados alrededor de las masas de huevo (Figura 3C; datos no registrados). Manzanilla-López (1997) mencionó que se han encontrado hasta 16 machos rodeando a las agallas que contienen a hembras infertilizadas en raíces de jitomate, esto ocurre porque la masa gelatinosa los atrae; también pueden encontrarse en la masa de huevo (1 a 18) o dentro de la agalla, al lado de la cola de la hembra.

Con base a los resultados de este estudio se puede concluir que se encontraron nematodos de todos los estadios biológicos (huevos, J2-J4, machos, hembras inmaduras y maduras) en los diferentes tiempos evaluados (15, 30 y 45 ddt); además, las poblaciones de Romita y Tetela mostraron la mayor capacidad parasítica sobre las raíces de jitomate cv Miroma, presentando flujos continuos de penetración e invasión en el sistema radical de las plantas. Finalmente, existen claras diferencias en el comportamiento de las poblaciones de *N. aberrans* en cuanto a su fecundidad, capacidad de penetración e invasión del sistema radical en plantas de jitomate, en función de su origen geográfico.

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

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618249/pdf/142.pdf>
- Cabrera-Hidalgo AJ, Marbán-Mendoza N, Valdovinos-Ponce G y Valadez-Moctezuma E. 2015. Genetic variability and phylogenetic analyses of *Nacobbus aberrans sensu lato* populations by molecular markers. *Nematropica* 45(2): 263-278. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/87387>
- Cristóbal-Alejo J, Cid del Prado IV, Marbán-Mendoza N, Sánchez GP, Mora-Aguilera G y Manzanilla-López RH. 2001. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica* 31(2): 229-235. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/69628>
- Evans AAF y Perry RN. 2009. Survival mechanisms, pp. 201-222. En: Perry, R. N., Moens, M., and Starr, J. L. (eds.). Root-knot nematodes. CAB International. Wallingford, Oxon. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0201>
- FAO/STAT, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2021. Cultivos. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (consulta marzo 2021).
- Fernández M y Ortega J. 1982. Comportamiento de las poblaciones de nematodos fitoparásitos en plátano enano Cavendish. *Ciencias de la Agricultura* 13: 7-17.
- Huang SP y Pereira AC. 1994. Influence of inoculum density, host, and low temperature period on delayed hatch of *Meloidogyne javanica* eggs. *Journal of Nematology* 26(1): 72-75. <https://journals.flvc.org/jon/article/view/66604/0>
- Insera, R. N., Griffin G. D. y Anderson J. L. 1985. The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Research Bulletin, Utah Agricultural Experimental Station* No. 510. 14 p.
- Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Kelder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López RH, Palomares-Rius JE, Wesemael WML y Perry RN. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9): 946-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>
- McSorley R. 2003. Adaptations of nematodes to environmental extremes. *Florida Entomologist* 86(2): 138-142. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2003\)086\[0138:AONTEE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2003)086[0138:AONTEE]2.0.CO;2)
- Manzanilla-López RH. 1997. Studies on the characterisation and bionomics of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae). Ph. D. Thesis. University of Reading, U.K. 395 p.
- Manzanilla-López RH, Costilla MA, Doucet M, Insera RN, Lehman PS, Cid del Prado-Vera I, Souza RM y Evans K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32(2): 149-227. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/69655>
- Martínez-Fuentes R, Tovar-Soto A y Torres-Coronel R. 2010. Penetración y Establecimiento de *Nacobbus aberrans* [(Thorne 1933) Thorne y Allen, 1944] Población Chapingo en Cultivares de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1): 61-63. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100007)
- Perry RN. 1997. Plant signals in nematode hatching and attraction. pp. 38-50. En: Fenoll C., Grubler F.M.W., Ohl S.A. (eds) Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions. *Developments in Plant Pathology*, vol 10. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5596-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5596-0_4)
- Prasad SK y Webster JM. 1967. Effect of temperature on the rate of development of *Nacobbus serendipiticus* in excised tomato roots. *Nematologica* 13(1): 85-90. <https://doi.org/10.1163/187529267X00968>
- SIAP-SIACON, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. 2021. Modulo Agrícola Estatal. <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430> (consulta marzo, 2021).
- Sikora EJ y Noel GR. 1996. Hatch and emergence of *Heterodera glycines* in root leachate from resistant and susceptible soybean cultivars. *Journal of Nematology* 28(4): 501-509. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19277168/>
- Souza RM y Baldwin JG. 2000. Differential behaviour of the survival stages of *Nacobbus aberrans* (Nemata: Pratylenchidae) under sub-optimal environments. *Nematologica* 2(2): 211-215. <https://doi.org/10.1163/156854100508944>
- Umesh KC. 1994. Competition between the plant-parasitic nematodes *Pratylenchus neglectus* and *Meloidogyne chitwoodi*. *Journal of Nematology* 26(3): 286-295. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619500/pdf/286.pdf>
- Van Gundy SD. 1985. Ecology of *Meloidogyne* spp. -emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. pp. 177-182. En: Sasser J. N., and Carter C. C. (eds.). *An Advanced Treatise of Meloidogyne*. Vol. I. Biology and Control. Carolina State University Graphics, Raleigh, NC.
- Zheng L y Ferris H. 1991. Four types of dormancy exhibited by eggs of *Heterodera schachtii*. *Revue de Nématologie* 14(3): 419-426. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.539.4099&rep=rep1&type=pdf>

# First report of *Clonostachys rosea* associated with avocado fruit rot in Puebla, Mexico

## Primer reporte de *Clonostachys rosea* asociado a la pudrición del fruto de aguacate en Puebla, México

Wendy Abril Coyotl-Pérez, Omar Romero-Arenas, Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Pedro Zacachimalpa, 72960, Puebla, México; Clemente Mosso-González, CONACyT-Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP), 4a. Av. Nte. esquina 19, Norte, Centro, CP 30700 Tapachula, Chiapas, México; Yesenia Pacheco-Hernández, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, Km 9.6 Carretera Irapuato-León, CP 36824, Irapuato, Guanajuato, México; José Antonio Rivera-Tapia, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria. C.P. 72570, Puebla, México; Nemesio Villa-Ruano\*, CONACYT-Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología.

\*Corresponding author: [necho82@yahoo.com.mx](mailto:necho82@yahoo.com.mx); [nemesio.villa@conacyt.mx](mailto:nemesio.villa@conacyt.mx)

Received: March 18, 2021.

Accepted: April 22, 2022.

Coyotl-Pérez WA, Romero-Arenas O, Mosso-González C, Pacheco-Hernández Y, Rivera-Tapia JA and Villa-Ruano N. 2022. First report of *Clonostachys rosea* associated with avocado fruit rot in Puebla, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 298-307.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-5>

Primera publicación DOI: 26 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 26, 2022.

**Abstract.** The northern highlands of Puebla are considered a new potential area for the cultivation of Hass avocado. Then, the emergence of new phytopathogens related to this geographical area is latent. The aim of this investigation was to isolate the microorganisms linked to the avocado fruit rot recently recorded by the producers of this locality

**Resumen.** La sierra norte de Puebla se considera una nueva zona potencial para el cultivo del aguacate Hass. Debido a este motivo, la emergencia de nuevos fitopatógenos aliados a esta zona geográfica queda latente. El objetivo de esta investigación fue aislar los microorganismos asociados a la pudrición del fruto del aguacate reportado recientemente por los productores de esta localidad en el año 2021. La morfología fúngica ligada a la pudrición del aguacate se aisló bajo experimentos en cámara de humedad y se denominó C08-9. El agente fúngico presentó micelio blanco con rápido crecimiento radial ( $6.5 \text{ mm día}^{-1}$ ) en agar dextrosa y papa y viró el medio de cultivo a color amarillo a los 7 días. Este presentó conidióforos penicilados adheridos a hifas hialinas organizadas en verticilos con tres o cuatro fiálides, mientras que los conidios primarios mostraron forma ovalada o sub-ovalada. Las dimensiones promedio de los conidios fue de  $10.57 \mu\text{m} \times$

in 2021. The fungus associated with the avocado fruit rot was isolated under humidity chamber conditions and it was named as C08-9. The fungal agent presented white cotton mycelium with fast radial growth ( $6.5 \text{ mm day}^{-1}$ ) in potato dextrose agar and it turned the culture medium to yellow color after seven days. The fungus contained penicillate conidiophores adhered to hyaline hyphae organized in whorls with three or four phialides whereas primary conidia showed oval to sub-oval shape. The average size of the conidia was  $10.57 \mu\text{m} \times 4.42 \mu\text{m}$  and the presence of chlamydo spores was also recorded. The molecular identification of the fungus was achieved by amplifying the partial nucleotide sequences of the 18S ribosomal gene (ITS; 543 bp) and the translation elongation factor 1 alpha gene (TEF-1 $\alpha$ ; 658 bp). The corresponding sequences were deposited at the NCBI-gene bank with the accessions OM473286 and OM715999, respectively.

**Key words:** *Persea americana* cv. Hass, soft rot, phytopathogenic fungus, northern highlands.

Mexico is the leading exporter of Hass avocado (*Persea americana*) in the world. The fruit is an important source of vitamins, fiber, phenols, and minerals that benefit human health (Rosero *et al.*, 2019). The most valuable nutrients of avocado are the unsaturated fatty acids accumulated in the pulp of the fruit (Rosero *et al.*, 2019). Like other fruits, avocados are a source of protein, fiber, and reducing sugars which are exploited by opportunistic phytopathogens. As a consequence of pathogen attack, fruit quality significantly decreases causing severe economic losses for producers.

Postharvest fungal diseases are one of the main threats to the avocado market. The *Colletotrichum*, *Lasioidiplodia*, *Sphaceloma*, *Pseudocercospora*,

$4.42 \mu\text{m}$  y también se registró la presencia de clamidosporas. La identificación molecular del hongo se logró mediante la amplificación de las secuencias parciales del gen ribosomal 18S (ITS; 543 pb) y del gen del factor de elongación 1 alfa (TEF-1 $\alpha$ ; 658 pb). Las secuencias correspondientes se depositaron en el banco de genes del NCBI con las accesiones OM473286 y OM715999, respectivamente.

**Palabras clave:** *Persea americana* cv. Hass, pudrición blanda, hongo fitopatógeno, sierra nororiental.

México es el principal exportador de aguacate Hass (*Persea americana*) en el mundo. El fruto es una fuente importante de vitaminas, fibra, fenoles y minerales que benefician la salud humana (Rosero *et al.*, 2019). Los nutrientes más valiosos del aguacate son los ácidos grasos insaturados acumulados en la pulpa del fruto (Rosero *et al.*, 2019). Al igual que otros frutos, los aguacates son una fuente de proteína, fibra y azúcares reductores que son aprovechados por fitopatógenos oportunistas. Como consecuencia del ataque de patógenos, la calidad de la fruta disminuye significativamente provocando graves pérdidas económicas para los productores.

Las enfermedades fúngicas poscosecha son una de las principales amenazas para el mercado del aguacate. Los géneros *Colletotrichum*, *Lasioidiplodia*, *Sphaceloma*, *Pseudocercospora*, *Rhizopus* y *Fusarium* se asocian comúnmente con el desarrollo de enfermedades poscosecha en aguacate (Perera *et al.*, 2020). Sin embargo, el espectro potencial de agentes fitopatógenos del aguacate puede variar según la región geográfica y las fluctuaciones climáticas. Puebla es el sexto productor de aguacate en México y la sierra norte de este estado se cataloga como una nueva zona para la producción de este valioso fruto. Al ser una zona nueva, la aparición

*Rhizopus*, and *Fusarium* genera are commonly associated with the development of postharvest diseases in avocado (Perera *et al.*, 2020). However, the potential spectrum of phytopathogenic agents of avocado may vary depending on the geographical region and climatic fluctuations. Puebla is the sixth producer of avocado in Mexico and the northern highlands of this state are tagged as a new area for the production of this valuable fruit. As a new area, the emergence of unknown species with infective potential is latent. In 2021, the avocado producers from the northern highlands of Puebla-Mexico reported an aggressive fruit blotch that caused severe damage and substantial economic losses in harvested avocados. In order to address the problem, this investigation was focused on the identification and isolation of the phytopathogen associated with this disease.

Under open field conditions, the symptoms of diseased fruits were loss of turgor, changes in fruit size, eventual mycelium emergence as well as pulp oxidation (Figure 1A). The incidence of fruit blotch was 56.9% in samples of different ripening stages. For further investigation, 50 diseased fruits (n=50) were harvested from 30 plants grown in 10 different plots during April 2021 in Yaonáhuac, Puebla, Mexico (19° 56' 55" N, 97° 26' 26" W; 1997 masl). These samples were transferred to the laboratory in plastic bags at 4 °C to be immediately sanitized by immersion in 20% sodium hypochlorite for 20 min and rinsed several times with sterile distilled water in a sterile cabinet (Pérez *et al.*, 2021). Posteriorly, these fruits were dried and placed in sterile humidity chambers (n=30) for 10 days at 28 °C and 70% relative humidity in order to identify the microorganisms associated with avocado rot (Pérez *et al.*, 2021).

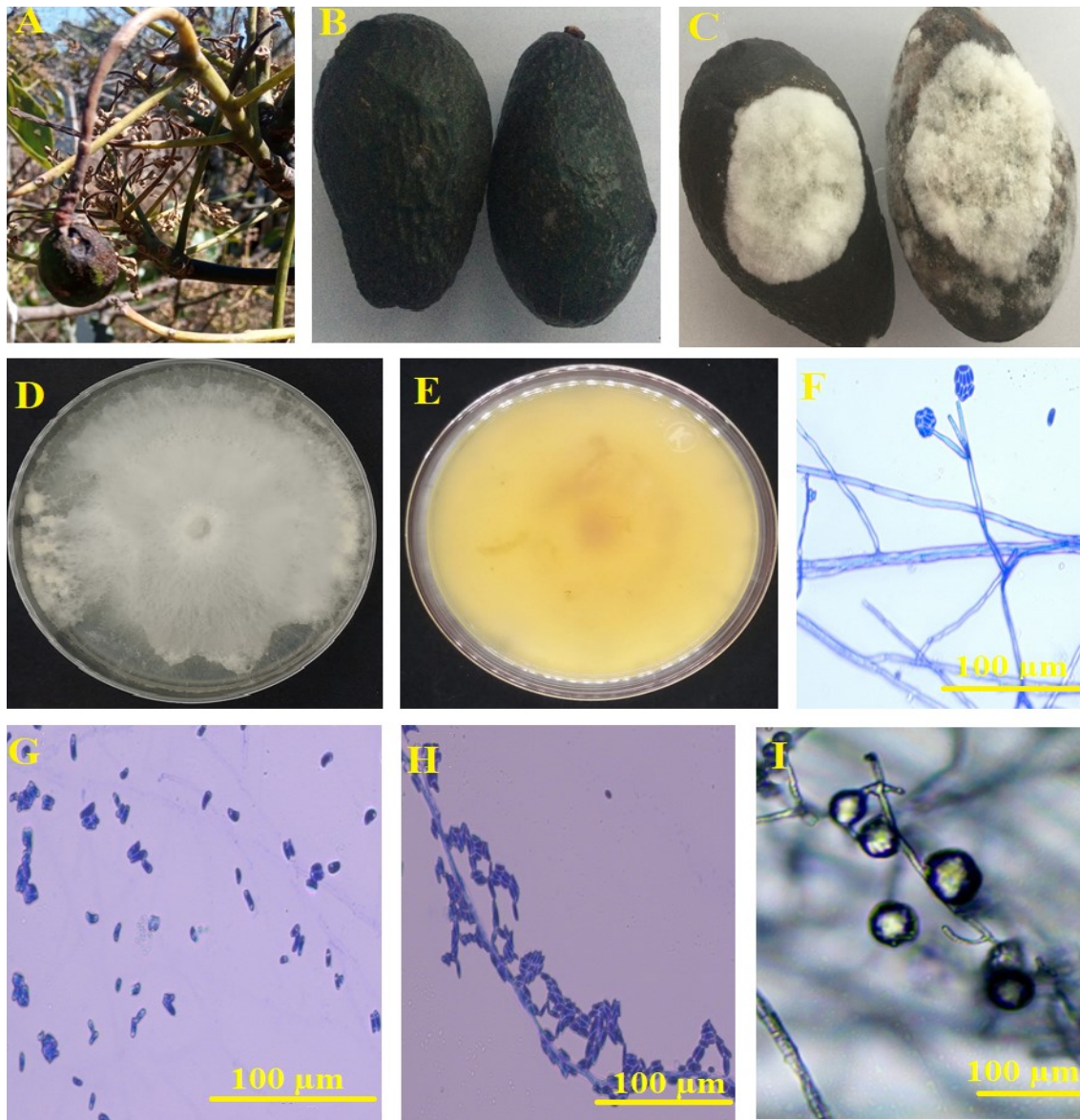
Five different fungal morphologies were observed, isolated, and maintained in potato dextrose agar (PDA; Bioxon™) during these

de especies desconocidas con potencial infectivo es latente. En 2021, los productores de aguacate de la sierra norte de Puebla-México reportaron una pudrición agresiva en el fruto que causó daños severos en la producción de aguacate y pérdidas económicas sustanciales. Para abordar el problema, esta investigación se centró en la identificación y aislamiento del fitopatógeno asociado a esta enfermedad.

En condiciones de campo abierto, los síntomas de los frutos enfermos fueron pérdida de turgencia, cambios en el tamaño del fruto, eventual emergencia de micelio y oxidación de la pulpa (Figura 1A). La incidencia de frutos enfermos fue del 56.9% en muestras con diferente estado de maduración. Para investigación subsecuente, se cosecharon 50 frutos enfermos (n=50) de 30 plantas cultivadas en 10 parcelas diferentes durante abril de 2021 en Yaonáhuac, Puebla, México (19° 56' 55" N, 97° 26' 26" O; 1997 msnm). Estas muestras se trasladaron al laboratorio en bolsas plásticas a 4 °C para ser sanitizadas inmediatamente por inmersión en hipoclorito de sodio al 20% durante 20 min y se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril en campana de flujo laminar (Pérez *et al.*, 2021). Posteriormente, los frutos fueron secados y colocados en cámaras de humedad estériles (n=30) durante 10 días a 28 °C y 70% de humedad relativa con el fin de identificar los microorganismos asociados a la pudrición del aguacate (Pérez *et al.*, 2021).

Durante estos experimentos se observaron, aislaron y mantuvieron cinco morfologías fúngicas diferentes en agar papa dextrosa (PDA; Bioxon™). Las pruebas preliminares de patogenicidad se realizaron mediante la inserción de discos hifales (5 mm de diámetro) de cada hongo en aguacates sanos (recolectados en la zona de estudio) para su posterior incubación en una cámara de humedad durante 21 días. Como resultado, una morfología (designada como aislado C08-9) produjo signos de





**Figure 1.** Macroscopic and microscopic features of *C. rosea* strain C08-9 isolated in the northern highlands of Puebla, Mexico. A, Diseased fruits collected under open field conditions. B, Asymptomatic avocados treated with pure saline solution after 21 days post-inoculation. C, Diseased avocados treated with 1000 conidia dissolved saline solution after 21 days post-inoculation. D, Hyaline mycelium of *C. rosea* strain C08-9 from PDA cultures of 5 days old. E, Changes in the coloration of PDA medium caused by *C. rosea* strain C08-9. F, Penicillate conidiophores organized in whorls adhered to hyaline hyphae containing three or four phialides. G-H, Primary conidia showing oval or sub-oval shape. I, Chlamydospores linked to hyaline hyphae.

**Figura 1.** Características macroscópicas y microscópicas de la cepa C08-9 de *C. rosea* aislada en la sierra norte de Puebla, México. A, Frutos enfermos recolectados en condiciones de campo abierto. B, Aguacates asintomáticos tratados con solución salina pura 21 días después de la inoculación. C, Aguacates enfermos tratados con 1000 conidios disueltos en solución salina después de 21 días de la inoculación. D, Micelio hialino de *C. rosea* cepa C08-9 en cultivos de PDA de 5 días de edad. E, Cambios en la coloración del medio PDA provocados por la cepa C08-9 de *C. rosea*. F, Conidióforos penicilados organizados en verticilos adheridos a hifas hialinas que contienen tres o cuatro fiálicas. G-H, conidios primarias que muestran forma ovalada o sub-ovalada. I, Clamidosporas unidas a hifas hialinas.

experiments. Preliminary pathogenicity tests were done by inserting hyphal discs (5 mm diameter) of each fungus in healthy avocados (collected in the zone of study) for further incubation in a humidity chamber for 21 days. As a result, one morphology (designed as C08-9 isolate) produced signs of infection on the sixth-day post-inoculation whereas the other fungi did not produce any symptoms after 21 days. Formal pathogenicity tests were carried out in asymptomatic Hass avocados (n=20) using approximately 1000 conidia obtained from a monosporic culture of the isolate C08-9 (10 µL of a sterile saline solution containing  $1 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>). The conidia were inoculated by mechanical penetration using a Hamilton syringe in the pericarp of sanitized asymptomatic avocados (n=20) under humidity chamber conditions. The control group (n=20) was only treated with an equivalent volume of saline solution. The microorganism associated with avocado fruit rot was re-isolated and subjected to molecular tests together with the original monosporic culture used. The molecular analyses were done with genomic DNA extracted as previously reported by Pérez *et al.* (2021). The molecular identity of the associated fungus was obtained by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) of the 18S ribosomal gene using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) and the PCR conditions previously reported by Duque-Bautista *et al.* (2017). The identity was confirmed by amplifying the translation elongation factor 1 alpha gene (TEF-1α) using the primers EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) and EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (Molnár *et al.*, 2015) using the same PCR conditions described by Duque-Bautista *et al.* (2017). The corresponding PCR products were purified with the GenElute™ PCR Clean-Up Kit from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis Mo. USA) and sequenced at Macrogen

infección en el sexto día posterior a la inoculación, mientras que los otros hongos no produjeron ningún síntoma después de 21 días. Se realizaron pruebas formales de patogenicidad en aguacates Hass asintomáticos (n=20) utilizando aproximadamente 1000 conidias obtenidas de un cultivo monospórico del aislado C08-9 (10 µL de una solución salina estéril con  $1 \times 10^5$  conidias mL<sup>-1</sup>). Las conidias fueron inoculadas por penetración mecánica en el pericarpio de aguacates asintomáticos desinfectados utilizando una jeringa Hamilton (n=20) en condiciones de cámara de humedad. El grupo de control (n=20) solo fue tratado con un volumen equivalente de solución salina. El microorganismo asociado a la pudrición del fruto del aguacate fue re-aislado y sometido a pruebas moleculares junto con el cultivo monospórico originalmente usado. Los análisis moleculares se realizaron con ADN genómico extraído como lo reporta previamente Pérez *et al.* (2021). La identidad molecular del hongo asociado se obtuvo secuenciando el espaciador transcrito interno (ITS) del gen ribosomal 18S utilizando los cebadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) y las condiciones de PCR reportadas previamente por Duque-Bautista *et al.* (2017). La identidad se confirmó amplificando el gen del factor de elongación de traducción 1 alfa (TEF-1α) utilizando los cebadores EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) y EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (Molnár *et al.*, 2015) utilizando las mismas condiciones de PCR descritas por Duque-Bautista *et al.* (2017). Los productos de PCR correspondientes se purificaron con el GenElute™ PCR Clean-Up Kit de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis Mo. EE. UU.) y se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias correspondientes se almacenaron en la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La caracterización morfológica se realizó con un

Inc. (Seoul, South Korea). The corresponding sequences were stored in the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The morphological characterization was done with a monosporic culture grown in PDA for 7 days which was exposed to the sunlight for 3 h followed by incubation at 4 °C for 4 h during a period of 10 days with the aim to be stressed. Microcultures prepared with the same medium were subjected to the same stressing process. After 10 days, the cultures and microcultures were subjected to microscopic analysis using a Primo Star Carl Zeiss Primo Star apparatus. The size of the conidia was calculated using the software Carl Zeiss™ AxioVision Rel. 4.8.2. The construction of the phylogenetic tree was done using sequences with high homology to that of *C. rosea* which were obtained from the NCBI nucleotide database. The sequences of both molecular markers (ITS and TEF-1 $\alpha$ ) were subjected to multiple alignments using the software Clustal X version 2.0. Posteriorly, the sequences were analyzed using the software MEGA 11.0.11 to be concatenated and to obtain a phylogenetic tree. The sequences subjected to phylogenetic analyses were those of the accessions MK752438.1, MK752494.1, MK752493.1, MK752436.1, MK752439.1, MK752495.1, MK752440.1, MK752496.1, MK752434.1, MK752492.1, MZ433204.1, MZ451398.1, MZ433200.1, MZ451395.1, MZ433199.1, MZ451394.1, MZ433198.1, MZ451393.1, MZ425507.1, MZ451389.1, MT215574.1, MT415234.1, MW199070.1, MW295970.1, OM473286.1 and OM715999.1. *Trichoderma stromaticum* strain GJS 97-181 was considered as an external parameter to contrast the results. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The bootstrap approaches were done with 1000 permutations. The tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary

cultivo monospórico crecido en PDA por 7 días el cual fue expuesto a la luz solar por 3 h seguido de incubación a 4 °C por 4 h durante un período de 10 días con el fin de estresarlo. Los microcultivos preparados con el mismo medio se sometieron al mismo proceso de estrés. Después de 10 días, los cultivos y microcultivos se sometieron a análisis microscópico usando un aparato Primo Star Carl Zeiss Primo Star. El tamaño de las conidias se calculó utilizando el software Carl Zeiss™ AxioVision Rel. 4.8.2. La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando secuencias con alta homología a la de *C. rosea* que se obtuvieron de la base de datos de nucleótidos del NCBI. Las secuencias de ambos marcadores moleculares (ITS y TEF-1 $\alpha$ ) fueron sometidas a alineamientos múltiples utilizando el software Clustal X versión 2.0. Posteriormente, las secuencias se analizaron mediante el software MEGA 11.0.11 para ser concatenadas y así obtener un árbol filogenético. Las secuencias sometidas a análisis filogenéticos fueron las de las accesiones MK752438.1, MK752494.1, MK752493.1, MK752436.1, MK752439.1, MK752495.1, MK752440.1, MK752496.1, MK752434.1, MK752492.1, MZ433204.1, MZ451398.1, MZ433200.1, MZ451395.1, MZ433199.1, MZ451394.1, MZ433198.1, MZ451393.1, MZ425507.1, MZ451389.1, MT215574, MW071, 9MT.413 .1, MW295970.1, OM473286.1 y OM715999.1. *Trichoderma stromaticum* cepa GJS 97-181 se consideró como parámetro externo para contrastar los resultados. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. Las aproximaciones de “bootstrap” se realizaron con 1000 permutaciones. El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta. Se contempló un total de 2379 posiciones en el conjunto de datos final.

distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method. There were a total of 2379 positions in the final dataset.

According to the pathogenicity tests, healthy avocados inoculated with sterile saline solution did not present soft rot symptoms after 21 days post-inoculation (Figure 1B). However, avocados inoculated with conidia from the fungus associated with the fruit rot produced evident signs of infection after 6 days post-inoculation but, these were devastating after 21 days (Figure 1C).

The observed symptoms were loss of turgor, changes in epicarp pigmentation (melanin accumulation), and mycelial proliferation which were coincident with the features previously observed in the avocados collected in the zone of study (Figure 1A). The fungus presented white cotton mycelium with fast radial growth in PDA ( $6.5 \text{ mm day}^{-1}$ ) and it turned the culture medium to yellow color after 7 days (Figure 1D-1E). The microscopic features of the fungus revealed the presence of penicillate conidiophores organized in whorls containing three or four phialides (Sun *et al.*, 2020) (Figure 1F). The primary conidia showed oval or sub-oval shape (Figure 1G-1H). The average size of the conidia ( $n=200$ ) was  $10.57 \mu\text{m} \times 4.42 \mu\text{m}$ . The presence of chlamydo-spores was also observed (Figure 1I). These features coincided with the microscopic description reported by Sun *et al.* (2020) for *C. rosea*. The partial nucleotide sequences of the 18S ribosomal gene (ITS; 543 bp) and the translation elongation factor 1 alpha gene (TEF-1 $\alpha$ ; 658 pb) were deposited at the NCBI nucleotide databases with the accessions OM473286 and OM715999, respectively. The ITS sequences kept 99.6% homology with the accession MH864650 whereas the EF-1 $\alpha$  sequence had 99.8% homology with the accession KX184998 of *C. rosea* isolated from soil samples. These results

De acuerdo con las pruebas de patogenicidad, los aguacates sanos inoculados con solución salina estéril no presentaron síntomas de pudrición blanda después de 21 días post-inoculación (Figura 1B). Sin embargo, los aguacates inoculados con conidios provenientes del hongo asociado a la pudrición de la fruto produjeron signos evidentes de infección después de 6 días post-inoculación, pero estos fueron devastadores después de 21 días (Figura 1C).

Los síntomas observados fueron pérdida de turgencia, cambios en la pigmentación del epicarpio (acumulación de melanina) y proliferación micelial, los cuales coincidieron con las características previamente observadas en los aguacates recolectados en la zona de estudio (Figura 1A). El hongo presentó micelio algodonoso blanco con rápido crecimiento radial en PDA ( $6.5 \text{ mm día}^{-1}$ ) y viró el medio de cultivo a color amarillo a los 7 días (Figura 1D-1E). Las características microscópicas del hongo revelaron la presencia de conidióforos penicilados organizados en verticilos conteniendo tres o cuatro fiálides (Sun *et al.*, 2020) (Figura 1F). Las conidias primarias mostraron forma ovalada o sub-ovalada (Figura 1G-1H). El tamaño promedio de las conidias ( $n=200$ ) fue de  $10.57 \mu\text{m} \times 4.42 \mu\text{m}$ . También se observó la presencia de clamidosporas (Figura 1I). Estas características coincidieron con la descripción microscópica reportada por Sun *et al.* (2020) para *C. rosea*. Las secuencias parciales de nucleótidos del gen ribosomal 18S (ITS; 543 pb) y del gen del factor de elongación 1 alfa (TEF-1 $\alpha$ ; 658 pb) se depositaron en la base de datos de nucleótidos del NCBI con las accesiones OM473286 y OM715999, respectivamente. Las secuencias ITS mantuvieron 99.6% de homología con la accesión MH864650 mientras que la secuencia EF-1 $\alpha$  tuvo 99.8% de homología con la accesión KX184998 de *C. rosea* aislada de muestras de suelo. Estos resultados avalaron la identidad del hongo como *C.*

endorsed the identity of the fungus as *C. rosea*. To the best of our knowledge, there is not any report on the potential pathogenicity of *C. rosea* in avocados harvested around the world. However, previous investigations describe the devastating effect of a wild strain of *C. rosea* on *Vicia faba*, *Solanum tuberosum*, and *Glycine max* (Afshari and Hemmati, 2017). The phylogenetic analysis of the *C. rosea* strain isolated in this investigation (C08-9) revealed that the sum of the branch length was 0.22056366 and the corresponding scale for the concatenated sequences of the ITS-EF-1 $\alpha$  markers was 0.020 (Figure 2).

The strain C08-9 of *C. rosea* isolated in this investigation was grouped within samples reported

*rosea*. Hasta donde es sabido, no existe ningún informe sobre la patogenicidad potencial de *C. rosea* en los aguacates cosechados en todo el mundo. Sin embargo, investigaciones anteriores describen el efecto devastador de cepas silvestres de *C. rosea* en *Vicia faba*, *Solanum tuberosum* y *Glycine max* (Afshari y Hemmati, 2017). El análisis filogenético de la cepa de *C. rosea* aislada en esta investigación (C08-9) reveló que la suma de la longitud de la rama fue 0.22056366 y la escala correspondiente para las secuencias concatenadas de los marcadores ITS-EF-1 $\alpha$  fue 0.020 (Figura 2).

La cepa C08-9 de *C. rosea* aislada en esta investigación se agrupó dentro de muestras reportadas de diversos países. La mayor homología fue con

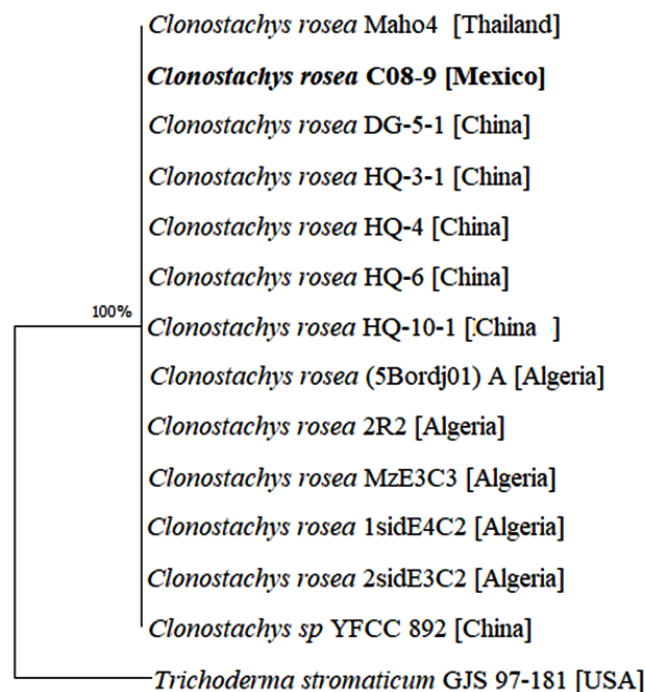


Figure 2. Phylogenetic analysis by the neighbor-joining method generated using MEGA 11.0.11 program with 1000 permutations for ITS/TEF-1 alpha sequences of *C. rosea*. *Trichoderma stromaticum* was used as an external reference and the strain C08-9 reported in this study is shown in bold font.

Figura 2. Análisis filogenético mediante el método neighbor-joining usando el programa MEGA 11.0.11 con 1000 permutaciones para las secuencias ITS/TEF-1 alfa de *C. rosea*. *Trichoderma stromaticum* se utilizó como referencia externa y la cepa C08-9 reportada en este estudio se muestran en negrita.

from diverse countries. The highest homology was with *C. rosea* isolated from the rotted root from *Astragalus membranaceus* grown in China, with the strain DG-5-1 isolated from the rotted root of *Angelica sinensis*, and with the strain Maho4 isolated from wild seeds and fruits collected in Thailand (Perera *et al.*, 2020). To construct a phylogenetic tree, *Trichoderma stromaticum* GJS 97-181 was considered as an external reference because of its genetic relationship with *C. rosea*. Our data indicate that *C. rosea* may have a monophyletic origin and probably the strain C08-9 is coming from a small housing population with pathogenic activity. As is known, the phenotypic variation produced by genetic changes associated with the adaptation process could probably be involved in the development of *C. rosea* pathogenicity. For further investigation, the strain C08-9 of *C. rosea* isolated in this investigation was cryopreserved in 15% glycerol at -80 °C in the ceparium of the Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. As a concluding remark, our investigation suggests the potential pathogenicity of *C. rosea* in avocado fruit and represents the first step to the generation of subsequent agroecological strategies to control this new threat to the avocado market.

#### ACKNOWLEDGMENTS

W.A.C.P. thank the fellowship 1024387 granted by CONACyT-Mexico to perform her MSc studies. She especially thank to the Coyotl-Pérez family and the Díaz-Pérez family for their unconditional support and dedicates this work to Rafaela Sandoval Pérez and Enrique Pérez Soriano. N.V.R. also thanks CONACyT-Mexico for the project 578 of the program “Investigadoras e Investigadores por México”.

*C. rosea* aislada de la raíz podrida de *Astragalus membranaceus* cultivada en China, con la cepa DG-5-1 aislada de la raíz podrida de *Angelica sinensis* y con la cepa Maho4 aislada de semillas y frutos silvestres recolectados en Tailandia (Perera *et al.*, 2020). Para construir un árbol filogenético, se consideró como referencia externa *Trichoderma stromaticum* GJS 97-181 por su relación genética con *C. rosea*. Los datos indican que *C. rosea* puede tener un origen monofilético y probablemente la cepa C08-9 proviene de una pequeña población habitacional con actividad patógena. Como es sabido, la variación fenotípica producida por cambios genéticos asociados al proceso de adaptación podría estar involucrada en el desarrollo de la patogenicidad de *C. rosea*. Para mayor investigación, la cepa C08-9 de *C. rosea* aislada en esta investigación fue criopreservada en glicerol al 15% a -80 °C en el cepario de la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Como comentario final, los resultados sugieren la patogenicidad potencial de *C. rosea* en el fruto de aguacate y representa el primer paso para la generación de estrategias agroecológicas posteriores para controlar esta nueva amenaza para el mercado del aguacate.

#### AGRADECIMIENTOS

W.A.C.P. agradece la beca 1024387 otorgada por CONACyT-México para realizar sus estudios de maestría. La autora expresa un agradecimiento especialmente a la familia Coyotl-Pérez y a la familia Díaz-Pérez por su apoyo incondicional y dedica este trabajo a Rafaela Sandoval Pérez y Enrique Pérez Soriano. N.V.R. también agradece a CONACyT-México por el proyecto 578 del programa “Investigadoras e Investigadores por México”.

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

LITERATURE CITED

- Afshari N and Hemmati R. 2017. First report of the occurrence and pathogenicity of *Clonostachys rosea* on faba bean. *Australasian Plant Pathology* 46: 231-234. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0482-3>
- Duque-Bautista H, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Villa-Ruano N. 2017. Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: an *in vitro* approach towards its biological control. *Mexican Journal of Phytopathology* 35: 326-337. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1701-2>
- Molnár O, Bartók T and Szécsi A. 2015. Occurrence of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium musae* on banana fruits marketed in Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62: 109-119. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.2>
- Perera RH, Hyde KD, Maharachchikumbura SSN, Jones EBG, McKenzie EHC, Stadler M, Lee, HB, Samarakoon MC, Ekanayaka AH, Camporesi E, Liu JK and Liu ZY. 2020. Fungi on wild seeds and fruits. *Mycosphere* 11: 2108-2480. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/14>
- Pérez VMAK, Morales MLA, Romero AO, Rivera A, Landeta CG and Villa-Ruano N. 2021. First report of *Fusarium temperatum* causing fruit blotch of *Capsicum pubescens* in Puebla, México. *Plant Disease*. *In press* <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1941-PDN>
- Rosero JC, Cruz S, Osorio C and Hurtado N. 2019. Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (*Persea americana* Mill.) cultivated in Colombia. *Molecules* 24(17): 320917. <https://doi.org/10.3390/molecules24173209>
- Sun ZB, Li SD, Xu JL, Lu X and Sun MH. 2020. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology* 129: 486-495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>