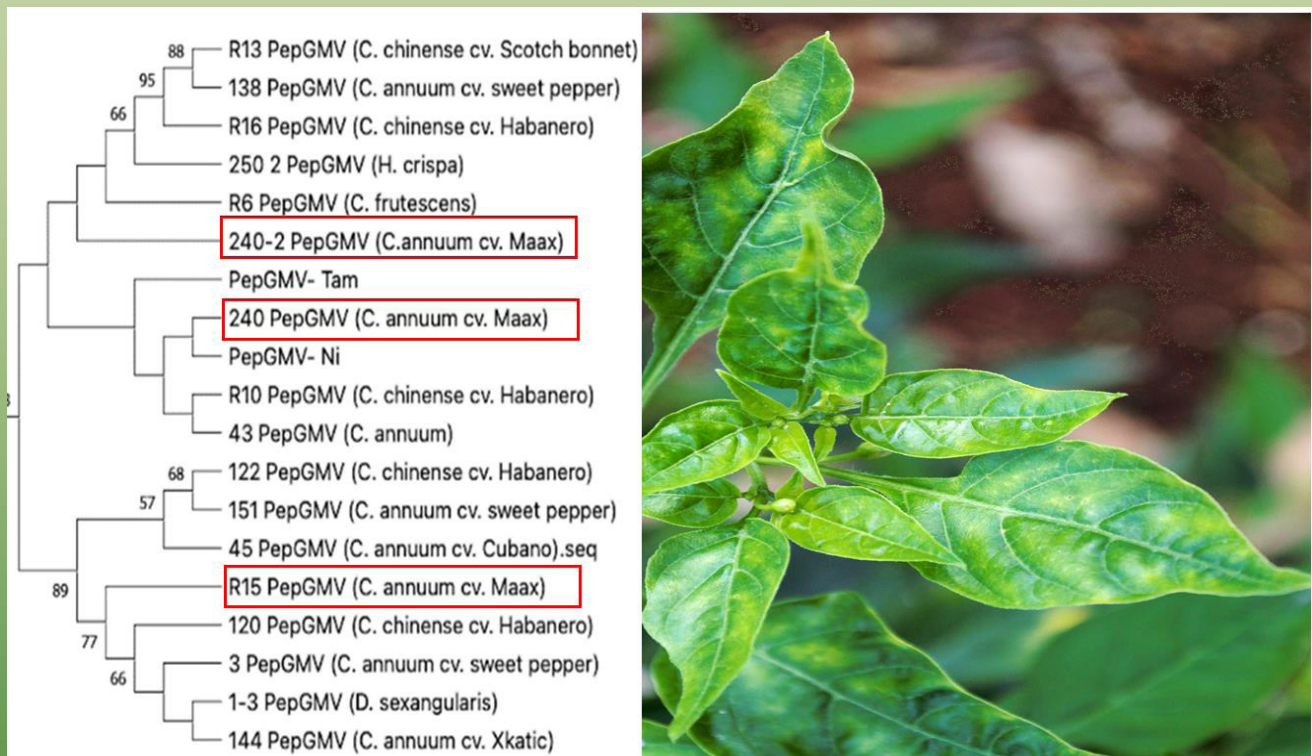


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 40, NÚMERO 3, Septiembre 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. 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. Norma Ávila Alistac, UACH

Dra. Marja Liza Fajardo Franco, UIEP

Dra. Liliana Carolina Córdova Albores, UdG

Dr. Raúl Díaz Moreno, UJED

Dr. Daniel Ruiz Juárez, UAM-X

Dr. José Terrones Salgado, UPAEP

Dr. Luciano Martínez Bolaños, UACH

Dr. Misael Martínez Bolaños, INIFAP

Dr. Esteban Rodríguez Leyva, COLPOS

Dr. Eduardo R. Garrido Ramírez, INIFAP

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEMEX

Dr. Remigio Anastacio Guzmán Plazola, COLPOS

Portada: Dendograma filogenético parcial que muestra la mayor prevalencia del *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) en *Capsicum* spp. Síntomas inducidos por PepGMV, único virus identificado en Chile silvestre (*C. annuum* var. *Aviculare* -Maax iik-). Los recuadros del dendograma en rojo muestran la variabilidad del virus en esta especie de Chile con base en la secuencia generada con los primers prAV324/AC889 del gen que codifica la proteína de la capsida.

Original: Gracia-Medrano RME, Maldonado-Borges JI, Sánchez-Cach LA, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C and Moreno-Valenzuela AO
Página: 387, 391.

SCIENTIFIC ARTICLES * ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Coinfection and *in vitro* interaction of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* associated with dieback in branches of mango (*Mangifera indica*) Manila variety, in Veracruz, Mexico * Coinfección e interacción *in vitro* de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* asociados a la muerte descendente en ramas de mango (*Mangifera indica*) variedad Manila, en Veracruz, México.
Saucedo-Picazo LE, Hernández-Montiel LG, Flores-Estévez N, Gerez-Fernández P, Argüello-Ortiz AF and Noa-Carrazana JC. 308

Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia* * Análisis genético de la resistencia a fungicidas en *Fusarium oxysporum* asociado a *Vanilla planifolia*.
González-Oviedo NA, Iglesias-Andreu LG, Flores-de la Rosa FR, Rivera-Fernández A and Luna-Rodríguez M. 330

Polyphenols extraction from creosote bush, tarbush, and soursop using ultrasound-microwave and their effect against *Alternaria alternata* and *Fusarium solani* * Extracción de polifenoles de gobernadora, hojasén, y guanábana utilizando ultrasonido-microondas y su efecto contra *Alternaria alternata* y *Fusarium solani*.
Castillo-Reyes F, De León-Juárez E, Nery-Flores SD, Flores-Gallegos AC, Campos-Muzquiz LG, Ascacio-Valdés JA and Rodríguez-Herrera R. 349

Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico * Identificación preliminar y relación filogenética de begomovirus asociados con *Capsicum* spp. en la península de Yucatán, México.
Gracia-Medrano RME, Maldonado-Borges JI, Sánchez-Cach LA, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C and Moreno-Valenzuela AO. 377

REVIEW ARTICLES * ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Biological control perspectives in the pine forest (*Pinus* spp.), an environmentally friendly alternative to the use of pesticides * Perspectivas del control biológico en pinares (*Pinus* spp.), una alternativa ambientalmente viable al uso de plaguicidas.
Gutiérrez-Flores LM, López-Reyes L, Hipólito-Romero E, Torres-Ramírez E, Castañeda-Roldán EI and Mauricio-Gutiérrez A. 401

PHYTOPATHOLOGICAL NOTES * NOTAS FITOPATOLÓGICAS

- Incidence of monkey's hand in maize germplasm from different locations in Mexico *** 425
Incidencia de la mano de chango en germoplasma de maíz (*Zea mays*) en diferentes localidades de México.
Márquez-Diego JJ, De León-García de Alba C, Rojas-Martínez RI, Rodríguez-Maciél JC and Nava-Díaz C.
- Spatial and temporal distribution of ojo de gallo (*Mycena citricolor*) in coffee plantations of the State of Mexico *** 433
Distribución espacial y temporal de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en cafetales del Estado de México.
Pino-Miranda E, Ramírez-Dávila JF, Serrato-Cuevas R, Mejía-Carranza J and Tapia-Rodríguez A.
- In vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugar cane to five fungicides *** 447
Sensibilidad *in vitro* de *Fusarium sacchari* aislado de caña de azúcar a cinco fungicidas.
Medina-Osti F, Gutiérrez-Díez A, Ochoa-Ascencio S and Sinagawa-García SR.
- In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* extracts against uredospore germination of *Hemileia vastatrix* *** 458
Actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extractos de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* contra la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix*.
Aguirre-Vega R, Alvarado-Castillo G, Ramírez-Benítez M del C, García-Pérez JA, Hernández-Martínez M de J, Torres-Pelayo V del R and Alarcón-Gutiérrez E.
- Diagrammatic scale for rust severity assessment in broad bean (*Vicia faba*) *** 474
Escala diagramática para evaluar la severidad de roya en haba (*Vicia faba*).
Fragoso-Benhumea JM, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildózola A, Franco-Mora O, Gutiérrez-Ibáñez AT, Contreras-Rendón A and García-Velasco R.

Coinfection and *in vitro* interaction of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* associated with dieback in branches of mango (*Mangifera indica*) Manila variety, in Veracruz, Mexico

Coinfección e interacción *in vitro* de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* asociados a la muerte descendente en ramas de mango (*Mangifera indica*) variedad Manila, en Veracruz, México

Liliana Eunice Saucedo-Picazo, ¹Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas Veracruzanas 101, Col. Emiliano Zapata. Xalapa, Veracruz, México, CP 91090; **Luis Guillermo Hernández-Montiel**, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, Baja California Sur, México, CP 23096; **Norma Flores-Estévez**; **Patricia Gerez-Fernández**, Centro de Investigaciones Tropicales. Universidad Veracruzana. Calle José María Morelos 44, Col. Centro. Xalapa, Veracruz, México, CP 91000; **Angel Fernando Argüello-Ortiz**, Facultad de Economía. Universidad Veracruzana. Av. Xalapa s/n, Col. Obrero Campesina. Xalapa, Veracruz, México, CP 91020; **Juan Carlos Noa-Carrazana***.

*Corresponding author: jnoa@uv.mx

Received: March 17, 2022.

Accepted: June 02, 2022.

Saucedo-Picazo LE, Hernández-Montiel LG, Flores-Estévez N, Gerez-Fernández P, Argüello-Ortiz AF and Noa-Carrazana JC. 2022. Coinfection and *in vitro* interaction of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* associated with dieback in branches of mango (*Mangifera indica*) Manila variety, in Veracruz, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 308-329.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-4>

First DOI publication: June 23, 2022.

Primera publicación DOI: 23 de Junio, 2022.

Resumen. La enfermedad de la muerte descendente causada por complejos fúngicos es un problema severo en árboles de mango (*Mangifera indica*). Sus principales síntomas son pudrición de ramas, gomosis y finalmente la muerte del árbol. En este trabajo se identificaron las especies del complejo fúngico causante de la muerte descendente del mango en la variedad Manila en Veracruz, México. Se evaluó la interacción *in vitro* de dos especies pertenecientes al complejo, así como la severidad de la coinfección en ramas de mango. Se identificó a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y

Abstract. Dieback disease caused by fungal complexes is a severe problem in mango trees (*Mangifera indica*). Its main symptoms are branch rot, gummosis, and finally, the tree's death. In this work, the species of the fungal complex causing mango dieback in the Manila variety in Veracruz, Mexico were identified. The *in vitro* interaction of two species belonging to the complex was evaluated and the severity of the co-infection in mango branches. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* were identified as causal agents of mango dieback in the producing area of Veracruz. In coinfecting mango branches, greater severity of necrosis was observed than in individual infections. Liquid culture filtrates applied in co-cultures showed different results for each species of phytopathogen. The *P. mangiferae* filtrate had no significant antagonistic effects on the growth of *L. pseudotheobromae* (inhibition of 2.68%), while the *L. pseudotheobromae* filtrate inhibited 41.38% of *P. mangiferae*. The results show that multiple infections in mango trees increase the damage caused by dieback, which could directly impact the development of control strategies.

Keywords: gummosis, virulence, interaction, fungal complex.

The mango fruit is consumed all over the world for its exceptional flavor, but it also has antioxidant, immunomodulatory, antiallergic, anti-inflammatory, antitumor, antidiabetic, and antiparasitic properties, among others (Swaroop *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2021). This tropical fruit is of economic importance (Altendorf, 2019) and Mexico is the main exporter worldwide. Its main markets are the United States, Canada and Japan (SADER, 2020). Fungal diseases are the main phytosanitary problem for mango crops, affecting

Pestalotiopsis mangiferae como agentes causales de la muerte descendente de mango en la zona productora de Veracruz. En ramas de mango coinfectadas se observó mayor severidad de necrosis que en las infecciones individuales. Los filtrados de cultivos líquidos aplicados en co-cultivos mostró resultados diferentes para cada especie de fitopatógeno. El filtrado de *P. mangiferae* no tuvo efectos antagonísticos significativos sobre el crecimiento de *L. pseudotheobromae* (inhibición del 2.7%), mientras que el filtrado de *L. pseudotheobromae* inhibió 41.4% el de *P. mangiferae*. Los resultados demuestran que la infección múltiple en árboles de mango incrementa el daño ocasionado por muerte descendente, lo cual podría impactar directamente en el desarrollo de las estrategias de control.

Palabras clave: gomosis, virulencia, interacción, complejo de hongos.

El mango es un fruto que se consume en todo el mundo por su excepcional sabor, además, tiene propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras, antialérgicas, antiinflamatorias, antitumorales, antidiabéticas, antiparasitarios, entre otras (Swaroop *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2021). Este frutal tropical es de importancia económica (Altendorf, 2019) y México es el principal país en exportación de mango a nivel mundial, siendo sus principales mercados: Estados Unidos, Canadá y Japón (SADER, 2020). Sin embargo, las enfermedades fúngicas son el principal problema fitosanitario en el cultivo afectando el rendimiento y calidad de la fruta (Elqassas y Abu-Naser, 2018). Una de las enfermedades importantes en los árboles de mango es la muerte descendente, la cual, es causada por diversas especies de hongos (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). La incidencia de esta enfermedad presenta incrementos; en algunos países como Omán, se ha

the yield and quality of the fruit (Elqassas and Abu-Naser, 2018). One of the most important diseases of mango trees is dieback, which is caused by various species of fungi (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). The incidence of this disease has been increasing; in some countries, such as Oman, the incidence is as high as 89% (Al-Adawi *et al.*, 2006), in Pakistan 83.3% (Khaskheli *et al.*, 2011), in Peru 29% (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). In Mexico, there have been no studies on the incidence of mango dieback, a lack that should be addressed. Sandoval-Sánchez *et al.* (2013) reported cases of dieback in mango trees in Mexico and their association with some phytopathogenic microorganisms. The present work assumed this premise and aimed to increase our knowledge of this disease in Manila mango trees in Mexico.

The characteristic symptoms of dieback in trees are gummosis, rotting of branches and trunk, decay, and chlorosis of the leaves (Marques *et al.*, 2013; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). The main fungal species associated with dieback belong to the family Botryosphaeriaceae and, recently, to the family Sporocadaceae (de-Oliveira *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021). The dominant genus of the family Botryosphaeriaceae is *Lasiodiplodia*, the most important species of which include *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. brasiliensis*, *L. iranensis*, *L. mahajangana*, and *L. hormozganensis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). In the family Sporocadaceae, the most significant genera are *Pestalotiopsis* and *Neopestalotiopsis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021). Chemical control of this disease has turned out to be a complex issue because the fungi are found in the xylem or parenchyma of branches and trunk (Al-Saadoon *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2019).

Coinfections are caused by multiple plant pathogens (Abdullah *et al.*, 2017) and dieback can be caused by various fungi (Chen *et al.*, 2012;

encontrado una incidencia de hasta el 89% (Al-Adawi *et al.*, 2006), en Pakistán del 83.3% (Khaskheli *et al.*, 2011) y en Perú de un 29% (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). Sin embargo, en México no se han hecho reportes de la incidencia de la muerte descendente del mango, por lo tanto, se requieren estudios para conocer el estatus de esta enfermedad. Sandoval-Sánchez *et al.* (2013) señalan incidencias de la muerte descendente en mango y su asociación con algunos microorganismos fitopatógenos. El presente trabajo retoma esta premisa y abona conocimientos de esta enfermedad en mango Manila.

Los síntomas característicos de la muerte descendente en los árboles son gomosis, pudrición de ramas y tronco, decaimiento y clorosis en las hojas (Marques *et al.*, 2013; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). Las principales especies de hongos asociadas a la muerte descendente pertenecen a la familia Botryosphaeriaceae y recientemente Sporocadaceae (de-Oliveira *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021). El género dominante de la familia Botryosphaeriaceae es *Lasiodiplodia*, destacando a las especies: *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. brasiliensis*, *L. iranensis*, *L. mahajangana* y *L. hormozganensis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). En la familia Sporocadaceae, destacan los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021). El control químico de esta enfermedad ha sido complejo, debido a que los hongos se encuentran en el xilema o parénquima de ramas y el tronco (Al-Saadoon *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2019).

Las coinfecciones son enfermedades causadas por múltiples fitopatógenos (Abdullah *et al.*, 2017) y la muerte descendente puede ser originada por diversos hongos (Chen *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2013). El efecto de las coinfecciones en plantas ha sido poco investigado debido a la complejidad de estos patosistemas, las

Kwon *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2013). The effect of coinfections in plants has been little studied due to the complexity of these pathosystems. The assessments that have been conducted so far have focused on virus-virus, bacterium-fungus and fungus-fungus coinfections (Tollenaere *et al.*, 2016). Some studies have shown that fungal coinfections increase the prevalence and severity of diseases and spore production (Fang *et al.*, 2021; Susi *et al.*, 2015). However, plant pathogens may inhibit each other (Orton and Brown 2016; Lerch-Olson and Robertson, 2020). In mango trees, dieback has been caused by species of *Lasiodiplodia* and *Pestalotiopsis*; however, the effect of coinfection with both phytopathogens on the severity of this disease in branches is still unknown.

Various species of *Lasiodiplodia* and *Pestalotiopsis* are of interest for different industries due to the antimicrobial, anti-inflammatory, mycotoxic and cytotoxic properties, among others, of the compounds that can be extracted from them (Qian *et al.*, 2021; Salvatore *et al.*, 2020). However, the effect of these compounds on other phytopathogenic fungi is unknown. Therefore, the present study aimed to isolate and identify the phytopathogenic fungi associated with dieback of Manila mango trees to determine their *in vitro* interaction and their effect on the coinfection of *Mangifera indica* branches.

MATERIALS AND METHODS

Study site

A commercial orchard of mango var. Manila with a plantation age of 40 years, located at 19° 30.161" N and 096° 35.460" W in Actopan, Veracruz, Mexico. Using directed sampling, ten trees with dieback symptoms (gummosis, rotting of

evaluaciones realizadas se han centrado en la coinfección de virus-virus, bacterias-hongos y hongo-hongo (Tollenaere *et al.*, 2016). Algunos estudios han demostrado que las coinfecciones fúngicas aumentan la prevalencia y severidad de las enfermedades y la producción de esporas (Fang *et al.*, 2021; Susi *et al.*, 2015). Sin embargo, puede haber inhibición de un fitopatógeno hacia otro (Orton y Brown 2016; Lerch-Olson y Robertson, 2020). La muerte descendente en arboles de mango ha sido ocasionada por especies de *Lasiodiplodia* y *Pestalotiopsis*, sin embargo, se desconoce el efecto de la coinfección de ambos fitopatógenos sobre la severidad de la enfermedad en ramas.

Por otra parte, diversas especies de *Lasiodiplodia* y *Pestalotiopsis* han sido estudiadas por diferentes industrias debido a que sus compuestos presentan efecto antimicrobiano, antiinflamatorio, micotóxico, citotóxico, entre otros (Qian *et al.*, 2021; Salvatore *et al.*, 2020). Sin embargo, se desconoce el efecto que tienen estos compuestos sobre otros hongos fitopatógenos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue aislar e identificar a los hongos fitopatógenos asociados a la muerte descendente de árboles de mango Manila, determinar su interacción *in vitro* y su efecto en la coinfección de ramas de *Mangifera indica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

Se seleccionó una huerta comercial de mango var. Manila con una edad de la plantación de 40 años ubicada a una latitud 19° 30.161" N y longitud 096° 35.460" O en Actopan, Veracruz, México. Con un muestreo dirigido se seleccionaron 10 árboles con síntomas de muerte descendente (gomosis, pudrición de ramas y troncos). En ramas secundarias

branches and trunk) were selected. Three segments of 15 cm were cut and collected from 5 cm thick secondary branches from each tree for a total of thirty samples. The samples were stored in sterile plastic bags for later analysis.

Isolation of fungi and morphological characterization

The thirty collected samples were cut into 2 cm long chips, which were disinfected in a solution of sodium hypochlorite and water at 1% v/v for 2 min. They were then rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile paper. Two chips of each sample were seeded in plates with potato-dextrose agar (PDA) plus ampicillin (40 mg mL⁻¹), at 3 cm from the plate center and incubated at 28 °C for 9 days. The monospore fungal cultures obtained were reseeded on PDA until 40 pure cultures were obtained. The fungi were morphologically classified by the shape and color of the colony into 15 groups. To observe the microscopic structures and identify the genus of each fungus, the plates were cultured by alternating white and black light every 12 h for 15 days. The shape and color of the mycelium were observed in the plates at days 1, 3, 5, 7 and 9. The structures of the fungi were stained with cotton blue (Jackson and Johnson-Cicalese, 1988) and examined with a phase contrast microscope Axio Lab.A1 HAL 35, FL-LED, 5x H. The identification was done using the taxonomic keys of Clendenin (1896) and Maharachchikumbura *et al.* (2014) according to color of pycnidia (*Lasiodiplodia*), color and shape of conidiomata (*Pestalotiopsis*), shape and color of hyphae, and shape, color, and size of conidia.

Molecular identification

The molecular identification of the fungi that showed greater aggressiveness was conducted

con grosor de 5 cm, se colectaron tres segmentos de 15 cm de cada árbol, para tener un total de 30 muestras. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico estériles para su posterior análisis.

Aislamiento de hongos y caracterización morfológica

Las 30 muestras colectadas fueron cortadas en astillas de 2 cm de largo, las cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio y agua al 1% v/v por 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en papel estéril. En placas con agar-papa-dextrosa (PDA) más ampicilina (40 mg mL⁻¹) se sembraron dos astillas de cada muestra a una distancia de 3 cm de la parte central y se incubaron a 28 °C por 9 días. Los cultivos fúngicos monospóricos obtenidos fueron resembrados en PDA hasta obtener 40 cultivos puros. Los hongos fueron clasificados por morfología de la forma y color de la colonia y se obtuvieron 15 grupos para su identificación. Para observar las estructuras microscópicas e identificar los géneros de cada hongo, las placas se cultivaron intercalando luz blanca y negra por 12 h por 15 días. En las placas se observó la forma y color de micelio durante los días 1, 3, 5, 7 y 9. Las estructuras de los hongos fueron teñidas con azul de algodón (Jackson y Johnson-Cicalese, 1988) y examinadas con un microscopio de contraste de fases Estativo Axio Lab.A1 HAL 35, FL-LED, 5x H. Se utilizaron las claves taxonómicas de Clendenin (1896) y Maharachchikumbura *et al.* (2014), observando: color de picnidios (*Lasiodiplodia*), color y forma de conidiomas (*Pestalotiopsis*), forma y color de hifas, forma, color y tamaño de los conidios.

Identificación molecular

La identificación molecular de los hongos que presentaron mayor agresividad se realizó a partir de

by extracting genomic DNA according to the protocol of Lee (1990). The genomic DNA was used to amplify the following: 1) The internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA (ITS1–5.8S-ITS2 group) with the primers ITS1F (5' TCCGTAGGTCAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), according to the method and PCR conditions described by Manter and Vivanco (2007); 2) A partial β -tubulin gene (*benA*) with primers Bt-2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') and Bt-2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') according to the method and PCR conditions described by Úrbez-Torres *et al.* (2008). The PCR products obtained were sent to the Instituto Potosino A.C. (IPICYT) for sequencing. The sequences obtained were analyzed with the Chromas Pro1.7.6 software. Identity was verified with the NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) system. The amplified ITS and β -tubulin rDNA sequences were deposited in the Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pathogenicity test

The pathogenicity test was performed on branches of mango var. Manila obtained from a newly planted commercial orchard free of dieback disease located in the town of Los Idolos in Actopan, Veracruz, Mexico. The health of the branches was verified visually and through cultures in PDA medium (See the section on isolation and characterization of the isolates). In addition, control branches inoculated with PDA medium were used to rule out disease development. The branches were cut into 15 cm long segments and disinfected with 70% alcohol for 30 s; they were then rinsed three times with sterile water. The isolates were grouped into fifteen groups according to the morphological

la extracción del ADN genómico de acuerdo con el protocolo de Lee (1990). Con el ADN genómico se amplificó: 1) La región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr (grupo ITS1–5.8S-ITS2) con los cebadores ITS1F (5' TCCGTAGGTCAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') acorde a la metodología y condiciones de PCR descritas por Manter y Vivanco (2007) y 2) Un gen parcial de β -tubulina (*benA*) con los cebadores Bt-2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') y Bt-2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') acorde con la metodología y condiciones de PCR descritas por Úrbez-Torres *et al.* (2008). Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar al Instituto Potosino A.C. (IPICYT). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Chromas Pro1.7.6 y se comprobó la identidad con el sistema BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias amplificadas del ITS y β -tubulina del ADNr fueron depositadas en el Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó en ramas de mango var. Manila, obtenidas de una huerta comercial de reciente plantación libre de la enfermedad de muerte descendente ubicada en la localidad de Los Ídolos en Actopan, Veracruz, México. Se comprobó la sanidad de las ramas de manera visual y a través de siembras en medio PDA (Ver sección aislamiento y caracterización de los aislados). Adicionalmente se utilizaron ramas control inoculadas con medio PDA para descartar desarrollo de la enfermedad. Las ramas fueron cortadas en segmentos de 15 cm de largo y desinfectadas con alcohol al 70% por 30 s; posteriormente, fueron enjuagadas tres veces con agua estéril. De acuerdo con las

characteristics of the mycelium. Of the fifteen groups, only 5 of the genus *Lasiodiplodia* and 2 of the genus *Pestalotiopsis* showed pathogenicity. A wound was made in the middle of each mango branch using a dissection needle. An 8-mm-diameter mycelial plug of each fungus, previously cultivated on PDA plates for 7 days at 28 °C, was placed in each wound. A plug of PDA medium without phytopathogen was inoculated into each wound as control. The branches were incubated in glass plates for 7 days at 28 °C with a relative humidity of 70-80%. The presence of necrosis and gum was observed in the branches. The lesion area (mm²) was measured at days 1, 3, 5 and 7. The percentage of incidence (%I) was determined through the formula $\%I = x/N \times 100$, where x represents the number of diseased branches and N is the total number of branches evaluated. The experiment was conducted with a completely randomized experimental design with five replications. The fungi were re-isolated on PDA plates to confirm Koch's postulates.

Evaluation of *in vitro* growth by dual culture technique

The *in vitro* tests were performed on the strain S10 of *L. pseudotheobromae* and strain MN2 of *P. mangiferae*, which were the most virulent in the pathogenicity test. The *in vitro* evaluation was performed according to the modified protocol of Lawrence *et al.*, (2018). The fungi were seeded on PDA plates for seven days at 28 °C. Previous observations had found differences in the growth rate of both phytopathogens; therefore, two experiments were proposed. The first consisted of placing two 8-mm plugs of *P. mangiferae* MN2 on the lateral part of each plate with PDA and incubating them for two days at 28 °C. Subsequently, two 8-mm plugs of *L. pseudotheobromae* S10 were inoculated 2 cm from the *P. mangiferae* MN2 colony and incubated

características morfológicas del micelio los aislados se agruparon en 15 grupos. De los 15 grupos solo 5 del género *Lasiodiplodia* y 2 de *Pestalotiopsis* presentaron patogenicidad. En medio de cada rama de mango se realizó una herida con una aguja de disección y en cada herida se colocó un taquete micelial de 8 mm de diámetro de cada hongo previamente cultivado en placas con PDA por 7 días a 28 °C. Como control se inoculó en cada herida un taquete de medio PDA sin fitopatógeno. Las ramas se incubaron por 7 días en placas de vidrio a 28 °C con una humedad relativa de 70-80%. Se observó la presencia de necrosis y de goma en las ramas y se cuantificó el área de lesión (mm²) a los días: 1, 3, 5 y 7. Se determinó el porcentaje de incidencia (%I) a través de la fórmula: $\%I = x/N \times 100$, donde, x representa el número de ramas enfermas y N es el número total de ramas evaluadas. El experimento se realizó con un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Los hongos fueron re-aislados en placas con PDA para confirmar los postulados de Koch.

Evaluación del crecimiento *in vitro* por técnica de cultivo dual

Las pruebas *in vitro* fueron realizadas con la cepa S10 de *L. pseudotheobromae* y MN2 de *P. mangiferae*, que fueron las de mayor virulencia en la prueba de patogenicidad. La evaluación *in vitro* se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Lawrence *et al.*, (2018). Los hongos fueron sembrados en placas con PDA por siete días a 28 °C. En observaciones previas se encontró diferencias en la velocidad de crecimiento de ambos fitopatógenos, por lo tanto, se plantearon dos experimentos. El primero, consistió en sembrar dos taquetes de 8 mm de *P. mangiferae* MN2 en la parte lateral de cada placa con PDA y se incubaron por dos días a 28 °C; posteriormente, se inocularon dos taquetes

for nine days at 28 °C. The second experiment consisted of performing a simultaneous inoculation of two 8-mm plugs (one of each phytopathogen) in the same plate with PDA. As a control, the fungi were also seeded individually in other PDA plates and a group of plates were inoculated with a plug of PDA medium without phytopathogen. The plates were incubated for 9 days at 28 °C. The coloration of the mycelium was observed in both fungi on days 1, 3, 5, 7 and 9. The presence of conidiomata was assessed in *P. mangiferae* MN2 on the same days. The stereoscopic microscope was used to check for any crossing of hyphae or the presence of an inhibition halo between them. Four replications of each treatment were performed with a completely randomized experimental design.

Assessment of fungal filtrates from *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*

The effect of fungal filtrates on the growth of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 was evaluated following the procedure described by Naglot *et al.* (2015) and Hajieghrari *et al.* (2008). Fungi were cultivated separately in potato dextrose broth in a shaker at 150 rpm for 14 days at 28 °C. The culture medium was centrifuged at 6,000 rpm for 30 min and subsequently filtered through a 0.20 µm sterile membrane (Whatman). Plates were prepared with PDA medium plus the filtrates of each phytopathogen at a concentration of 50% v/v. The fungi had been previously sown on PDA plates for seven days at 28 °C. The plates containing the filtrate of *L. pseudotheobromae* S10 were inoculated in the center with an 8 mm plug with *P. mangiferae* MN2. The plates with the filtrate of *P. mangiferae* MN2 were inoculated in the center with an 8 mm plug with *L. pseudotheobromae* S10. As a control, the fungi were inoculated individually in PDA medium. As an absolute control, a PDA plug

de 8 mm de *L. pseudotheobromae* S10 a 2 cm de la colonia de *P. mangiferae* MN2 y se incubaron por nueve días a 28 °C. El segundo experimento consistió en realizar la inoculación de manera simultánea de dos taquetes de 8 mm de ambos fitopatógenos en la misma placa con PDA. Como control los hongos fueron sembrados individualmente y un grupo de placas fueron inoculadas con un taquete de medio PDA sin fitopatógeno. Las placas se incubaron por 9 días a 28 °C. En los días 1, 3, 5, 7 y 9 se observó la coloración del micelio en ambos hongos y en *P. mangiferae* MN2 la presencia de conidios. En el microscopio estereoscópico se observó si existía cruzamiento entre hifas o un halo de inhibición entre ellas. Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento con un diseño experimental completamente al azar.

Evaluación de filtrados fúngicos de *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*

Para conocer el efecto de los filtrados fúngicos sobre el crecimiento de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 se realizó el protocolo de Naglot *et al.* (2015) y Hajieghrari *et al.* (2008). Los hongos por separado fueron cultivados en caldo papa dextrosa en un agitador a 150 rpm por 14 días a 28 °C. El medio de cultivo fue centrifugado a 6,000 rpm por 30 min y posteriormente fue filtrado a través de una membrana (Whatman) estéril de 0,20 µm. Se prepararon placas con medio PDA más los filtrados de cada fitopatógeno a una concentración del 50% vol/vol. Los hongos fueron previamente sembrados en placas con PDA por siete días a 28 °C. Las placas que contenían el filtrado de *L. pseudotheobromae* S10 fueron inoculadas con un taquete de 8 mm en la parte central con *P. mangiferae* MN2. Las placas con el filtrado de *P. mangiferae* MN2 fueron inoculadas con un taquete de 8 mm en la parte central con *L. pseudotheobromae* S10.

was inoculated in the PDA plates containing the filtrate of each fungus. The plates were incubated for 9 days at 28 °C. Four replicates per treatment were performed using a completely randomized experimental design. The coloration of the mycelium and, in the case of *P. mangiferae* MN2, the presence of conidiomata were recorded. The inhibition percentage (I) was measured according to the formula of Singh (2006): $I = (C-t)/C \times 100$, where *C* represents the diameter of the control colony and *t* the diameter of the colony with filtrate.

Fungal coinfection on mango branches

The effect of coinfection on mango branches was assessed using a modified protocol of Lawrence *et al.* (2018). *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 were previously seeded on PDA plates for 7 days at 28 °C. The branches were cut into 15 cm long segments, the surface was disinfected with 70% alcohol for 30 s and rinsed three times with sterile water. Two wounds, separated by 2 cm, were made in the central part of each branch with a sterile needle. An 8-mm-diameter mycelial plug of *P. mangiferae* MN2 was placed in the first wound, and an 8-mm-diameter mycelial plug of *L. pseudotheobromae* S10 was placed in the second one. For control purposes, branches were inoculated only with each fungus and another one was inoculated with plugs containing only PDA medium, without phytopathogen. The branches were incubated for seven days at 28 °C and a relative humidity of 70-80%. Five replicates were performed for each treatment in a completely randomized experimental design. The presence of necrosis and gum in the branches was recorded and the lesion area (mm²) was measured using the ImageJ program. The fungi were re-isolated on PDA plates to confirm Koch's postulates.

Como control se inocularon los hongos en forma individual en medio PDA y como control absoluto se inoculo un taquete de PDA en las placas con PDA que contenían el filtrado de cada hongo. Las placas se incubaron por 9 días a 28 °C. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se observó la coloración del micelio y en el caso de *P. mangiferae* MN2 la presencia de conidiomas. El porcentaje de inhibición (I) se midió de acuerdo a la fórmula de Singh (2006): $I = (C-t)/C \times 100$, donde *C* representa el diámetro de la colonia control y *t* el diámetro de la colonia con filtrado.

Coinfección de los hongos en ramas de mango

El efecto de las coinfecciones en ramas se realizó con el protocolo de Lawrence *et al.* (2018) con modificaciones. *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 fueron previamente sembrados en placas con PDA por 7 días a 28 °C. Las ramas fueron cortadas en segmentos de 15 cm de largo, la superficie fue desinfectada con alcohol al 70% por 30 s y enjuagadas tres veces con agua estéril. En la parte central de cada rama con una aguja estéril se realizaron dos heridas separadas por 2 cm. En la primera herida se colocó un taquete micelial de 8 mm de diámetro de *P. mangiferae* MN2, y en la segunda un taquete micelial de 8 mm de diámetro de *L. pseudotheobromae* S10. Para efectos de controles se incluyeron tratamientos de ramas inoculadas solo con cada hongo y otro inoculado solo con taquetes de medio PDA sin fitopatógeno. Las ramas se incubaron por siete días a 28 °C y una humedad relativa de 70-80%. Se realizaron cinco repeticiones por cada tratamiento con un diseño experimental completamente al azar. Se observó la presencia de necrosis y de goma en la rama y se cuantificó el área de lesión (mm²) a través del programa ImageJ. Los hongos fueron re-aislados en placas con PDA para confirmar los postulados de Koch.

Statistical analysis

The statistical analysis of the obtained data was based on analysis of variance (ANOVA) using the SPSS statistical software. The analyzed data corresponded to lesion area and inhibition percentage. Significant differences ($p \leq 0.05$) between means were determined using Tukey's post hoc test.

RESULTS

Isolation and morphological identification of fungi

Forty isolates were obtained, and 15 groups of fungi were formed from the sampled trees with dieback symptoms (Figure 1A-C). A representative of each group was characterized, resulting in 13 fungi of the genus *Lasiodiplodia* and two of the genus *Pestalotiopsis*. Seven isolates were selected for morphological identification according to their level of aggressiveness: five of them belonged to the species *L. pseudotheobromae* and two to the species *P. mangiferae*. The following morphological characteristics were observed for each fungus:

In the first three days, the five isolates of *L. pseudotheobromae* showed a white cottony mycelium (Figure 2D). In the fourth day, the mycelium showed a grayish color, and from day seven the color changed to grayish-black (Figure 2E). When the plates were exposed to black and white light, dark brown pycnidia were formed. The hyphae were filamentous, septate, with constricted septum, and dark brown in color. The conidia were ellipsoidal, with a rounded apex and base, two dark brown septa and an average size ($N=100$) of $23.4 \mu\text{m}$ in length \times $14.25 \mu\text{m}$ in width (Figure 2F). The five isolates were identified as *L. pseudotheobromae* according to Clendenin's taxonomic keys (1896).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se estimaron a través de las medias y desviaciones estándar mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando software estadístico SPSS. Los datos analizados fueron área de lesión y porcentaje de inhibición. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las medias se determinaron mediante la prueba post hoc Tukey's.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación morfológica de hongos

Se obtuvieron 40 aislamientos y se formaron 15 grupos de hongos de los árboles muestreados con síntomas de muerte descendente (Figura 1A-C). Se caracterizó un representante de cada grupo dando como resultado 13 de género *Lasiodiplodia* y dos de *Pestalotiopsis*. De acuerdo con el nivel de agresividad, fueron seleccionados siete aislamientos para la identificación morfológica: cinco pertenecientes a la especie *L. pseudotheobromae* y dos a la especie *P. mangiferae*. Las características morfológicas observadas de cada hongo fueron las siguientes:

Los cinco aislamientos de *L. pseudotheobromae* en los primeros tres días presentaron micelio algodonoso de color blanco (Figura 2D), en el cuarto día el micelio se pigmentó color grisáceo y a partir del día siete la coloración cambió a grisáceo negro (Figura 2E). Al exponer las placas en luz blanca y negra se formaron picnidios color marrón oscuro. Las hifas fueron filamentosas, septadas, constrictivas en el tabique y color marrón oscuro. Los conidios fueron elipsoidales, ápice y base redondeada, con dos septos color marrón oscuro, con un tamaño promedio ($N=100$) de $23.4 \mu\text{m}$ de largo \times $14.25 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 2F). De acuerdo con las

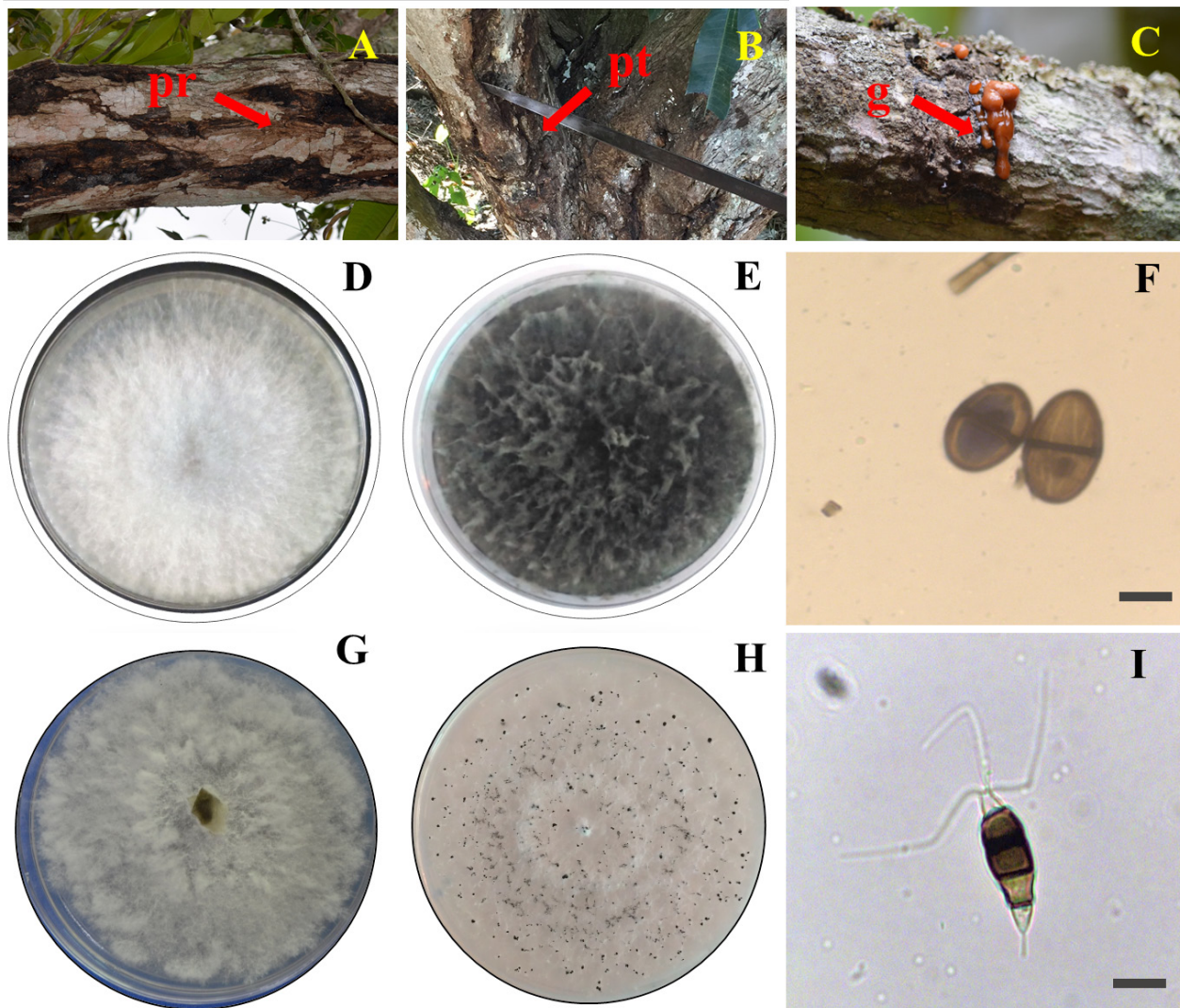


Figure 1. Symptoms of dieback in mango trees var. Manila and morphological characterization of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae*. A) Rotting on branches (pr), B) Rotting on trunk (pt), C) Gummosis (g), D) Mycelial growth of *L. pseudotheobromae* cottony white, E) Micellar growth of *L. pseudotheobromae* greyish-black, F) Conidia of *L. pseudotheobromae* dark brown (100x), G) Cottony white mycelial growth of *P. mangiferae*, H) Presence of *P. mangiferae* conidiomata e I) Conidia of *P. mangiferae* dark brown-black (100x).

Figura 1. Síntomas de la muerte descendente en árboles de mango var. Manila y caracterización morfológica de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae*. A) Pudrición en ramas (pr), B) Pudrición de tronco (pt), C) Gomosis (g), D) Crecimiento micelial de *L. pseudotheobromae* blanco algodonosos, E) Crecimiento micelar de *L. pseudotheobromae* grisáceo negro, F) Conidios marrón obscuro de *L. pseudotheobromae* (100x), G) Crecimiento micelial blanco algodonoso de *P. mangiferae*, H) Presencia de conidiomas de *P. mangiferae* e I) Conidios color marrón obscuro negro *P. mangiferae* (100x).

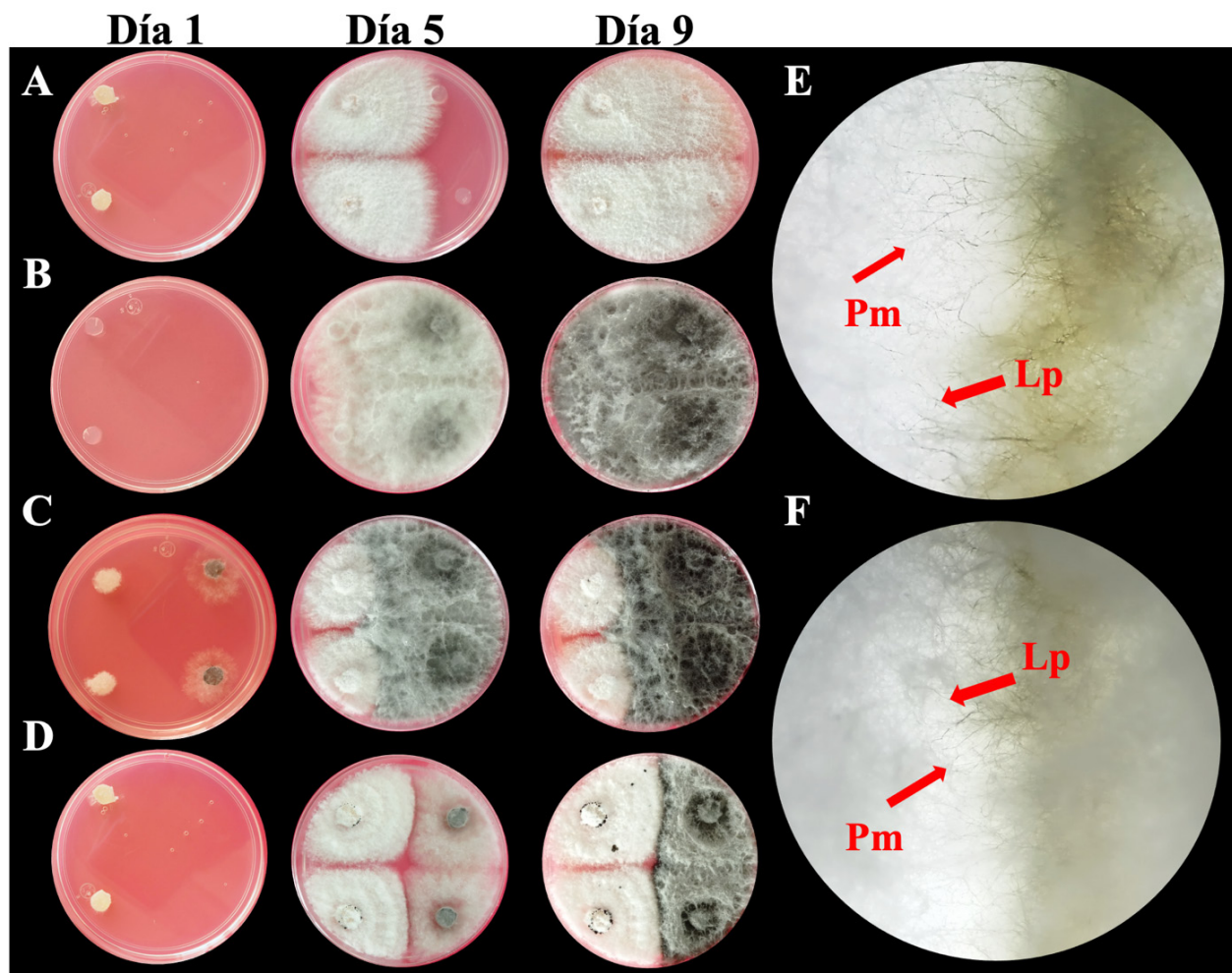


Figure 2. Mycelial growth of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* and hyphal interaction during the dual inoculation technique. A) *Pestalotiopsis mangiferae* MN2, B) *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10, C) *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10, D) Crossing of hyphae of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 inoculated two days later, E) Crossing of hyphae of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 and F) Interaction between *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 inoculated two days later.

Figura 2. Crecimiento micelial durante la técnica de inoculación dual de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* e interacción de hifas. A) *Pestalotiopsis mangiferae* MN2, B) *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10, C) *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10, D) Cruzamiento de hifas de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 inoculada dos días después, E) Cruzamiento de hifas de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 e F) Interacción *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 inoculada dos días después.

When subjected to alternating white and black light, the mycelial growth of *P. mangiferae* from days one to seven was irregular, cottony and diffuse, with a white coloration (Figure 2G). A cream coloration developed in the mycelium before the appearance of conidiomata. On day nine, black

claves taxonómicas de Clendenin (1896) los cinco aislamientos fueron identificados como *L. pseudotheobromae*.

Por otra parte, al intercalar luz blanca y negra el crecimiento micelial de *P. mangiferae* desde el día uno al siete fue irregular algodonoso y difuso con

pycnidial and globose conidiomata (Figure 2H) and hyaline and septate hyphae were observed. The indistinct brown conidia were slightly curved ellipsoid in shape with 4 septa and between 2 and 3 flagella. The average conidia size was 26.5 μm long \times 7.2 μm wide (Figure 2I). The two isolates were identified as *P. mangiferae* according to the taxonomic keys of Maharachchikumbura *et al.* (2014).

The sequences of the ITS and β -tubulin regions of three *Lasiodiplodia* isolates, as well as an ITS sequence from *Pestalotiopsis*, were deposited in GenBank. *L. pseudotheobromae* S10 (MH181156, OL988629), *L. pseudotheobromae* SN (MH179101, OL988630), *Lasiodiplodia* II3 (OK648476, OL988631), and *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 (MH179308). The resulting amplifications were 550 bp for the ITS and 430 bp for β -tubulin. Analysis of the sequences in the GenBank database identified the species *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* in the ITS regions by 100% and in the β -tubulin regions by 99%. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* were identified based on their morphological and molecular characteristics.

Pathogenicity tests

Necrosis and gummosis were observed after seven days in the mango branches inoculated with *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*. Significant differences ($P < 0.05$) were observed in the lesion area between the branches inoculated with each phytopathogen (Table 1). On day seven, isolate S10 of *L. pseudotheobromae* showed the highest aggressiveness compared to the rest of the isolates, generating a lesion area of 28.22 mm^2 . The MN2 isolate of *P. mangiferae* showed a larger lesion area of 8.44 mm^2 compared to the SN1 isolate. Isolates

una coloración blanca (Figura 2G). Antes de mostrar los conidiomas se desarrolló en el micelio una coloración crema. En el día nueve se presentaron conidiomas negros picnidiales y globosas (Figura 2H) e hifas hialinas y septadas. Los conidios color marrón indistintos de forma elipsoide ligeramente curvada con 4 septos y entre 2-3 flagelos. El promedio del tamaño de conidios fue de 26.5 μm de largo \times 7.2 μm de ancho (Figura 2I). De acuerdo con las claves taxonómicas de Maharachchikumbura *et al.* (2014) los dos aislamientos se identificaron como *P. mangiferae*.

Las secuencias de las regiones ITS y β -tubulina de tres aislamientos de *Lasiodiplodia*, así como una secuencia ITS de *Pestalotiopsis* fueron depositadas en el GenBank. *L. pseudotheobromae* S10 (MH181156, OL988629), *L. pseudotheobromae* SN (MH179101, OL988630) y *Lasiodiplodia* II3 (OK648476, OL988631) y *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 (MH179308). Las amplificaciones resultantes fueron de 550 pb para el ITS y 430 pb para la β -tubulina y el análisis de las secuencias en la base de datos del GenBank identificaron a las especies *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* en las regiones ITS en un 100% y β -tubulina en un 99%. De acuerdo con las características morfológicas y moleculares se identificó a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae*.

Pruebas de patogenicidad

Se observó después de siete días necrosis y gomosis en las ramas de mango inoculadas con *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el área de lesión de las ramas inoculadas con cada fitopatógeno (Cuadro 1). El aislamiento S10 de *L. pseudotheobromae* en el día siete presentó la mayor agresividad en comparación con el resto de los aislamientos,

Table 1. Lesion area in branches of mango var. Manila inoculated with isolates of *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*. Cuadro 1. Área de lesión de ramas de mango var. Manila inoculadas con aislamientos de *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*.

Aislamiento	Incidencia (%)	Día 1	Día 3	Día 5	Día 7
		Área de lesión (mm ²) ^y			
<i>L. pseudotheobromae</i> SN	100	3.77±0.5 d ^z	7±0.88cd ^z	12.77±0.83c ^z	21.55±0.5d ^z
<i>L. pseudotheobromae</i> LB2	100	2.44±0.38c	6.33±0.88c	10.11±0.50b	17.33±0.57c
<i>L. pseudotheobromae</i> S10	100	5.66±0.66 e	8.27±0.58d	15.44±0.83d	28.22±1.7e
<i>L. pseudotheobromae</i> AA	100	0.88±0.38a	1.56±0.32a	2.27±0.9a	3.33±0.4a
<i>L. pseudotheobromae</i> II3	100	2.44±0.38c	3.46±0.17b	8.22±0.5b	19.22±0.5cd
<i>P. mangiferae</i> MN2	100	2.33±0.33 c	2.78±0.1ab	4.22±1.5a	8.44±1b
<i>P. mangiferae</i> SN1	100	1.5 ±0.29 b	2.1±0.2 ab	2.56±0.6a	3.86±0.4a

^y Each value represents the mean ± standard deviation. ^z Means with different letters in each column are statistically different (Tukey, p≤0.05). / ^y Cada valor representa la media ± desviación estándar. ^z Medias con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

SN, LB2, S10 and II3 of the genus *Lasiodiplodia* caused a larger lesion area compared to the two isolates of *Pestalotiopsis*. The incidence rate of the disease was 100% in all the branches inoculated with both phytopathogens. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *P. mangiferae* were re-isolated from the branches, confirming Koch's postulates.

Evaluation of *in vitro* growth by dual culture technique

The results of the dual inoculation treatment did not show differences in the coloration of the mycelium between *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10. The presence of conidiomata in *P. mangiferae* MN2, which was inoculated two days before *L. pseudotheobromae*, was observed on the seventh day. Individual inoculations did not present conidiomata. In the plates inoculated two days later, the growth of both fungi seemed to auto-equalize. A crossing between the hyphae of both species was observed in the microphotographs (Figure 2E-F). No inhibition halos were observed in the contact zone between

generando un área de lesión de 28.22 mm². El aislamiento MN2 de *P. mangiferae* presentó un área mayor de lesión de 8.44 mm² en comparación al aislado SN1. Los aislados SN, LB2, S10 y II3 del género *Lasiodiplodia* causaron mayor área de lesión en comparación con los dos de *Pestalotiopsis*. El porcentaje de incidencia de la enfermedad fue del 100% en todas las ramas inoculadas con ambos fitopatógenos. De las ramas fueron re-aislados a *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*, confirmando los postulados de Koch.

Evaluación del crecimiento *in vitro* por técnica de cultivo dual

Los resultados del tratamiento de inoculación dual no presentaron diferencias en la coloración del micelio de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10. Se observó en el séptimo día la presencia de conidios en *P. mangiferae* MN2 cuando se inoculó dos días antes que *L. pseudotheobromae*, las inoculaciones individuales no presentaron las estructuras. En las placas inoculadas dos días después se observó un auto emparejamiento en el crecimiento de ambos hongos. En las microfotografías

P. mangiferae MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 (Figure 2A-D).

***In vitro* evaluation of fungal filtrates**

The percentage of inhibition of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 showed significant differences ($P < 0.05$) between the treatments. No changes were observed in the coloration of the mycelium during the growth of both fungi. *P. mangiferae* MN2 did not show conidiomata. The filtrate of *L. pseudotheobromae* S10 inhibited the growth of *P. mangiferae* MN2 by 41.38%. The percentage of inhibition of the filtrate of *P. mangiferae* MN2 on the growth of *L. pseudotheobromae* S10 was 2.68%.

Coinfection of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* in mango branches

Gummosis and necrosis were observed in mango branches inoculated with *L. pseudotheobromae* S10 and *P. mangiferae* MN2 (Figure 3). There were significant differences in lesion area between the coinfection and individual infection treatments. In coinfection treatments, the lesion area was larger

se observó un cruzamiento entre las hifas de ambas especies (Figura 2E-F). No se observaron halos de inhibición en la zona de contacto entre *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 (Figura 2A-D).

Evaluación *in vitro* de filtrados fúngicos

El porcentaje de inhibición de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Durante el crecimiento de ambos hongos no se observaron cambios en la coloración del micelio. *P. mangiferae* MN2 no presentó conidiomas. El filtrado de *L. pseudotheobromae* S10 inhibió el crecimiento de *P. mangiferae* MN2 en 41.38%. El porcentaje de inhibición del filtrado de *P. mangiferae* MN2 sobre el crecimiento de *L. pseudotheobromae* S10 fue de 2.68%.

Coinfección de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* en ramas de mango

Se observó gomosis y necrosis en las ramas de mango inoculadas con *L. pseudotheobromae* S10 y *P. mangiferae* MN2 (Figura 3). Entre los



Figure 3. Coinfection in Manila mango branches on days 1, 3 and 5. A. Individual inoculation of *L. pseudotheobromae* S10. B. Individual inoculation of *P. mangiferae* MN2. C. Dual inoculation of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10.

Figura 3. Coinfección en ramas de mango variedad Manila a los días 1, 3 y 5. A. Inoculación individual de *L. pseudotheobromae* S10. B. Inoculación individual de *P. mangiferae* MN2. C. Inoculación dual de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10.

compared to individual inoculations (Table 2). The lesion area was clearly seen to increase significantly in coinfection treatments. The control branches did not show a lesion area. The presence of gummosis, a characteristic symptom of dieback, was not observed. Necrotic tissue was obtained from each branch and the species *L. pseudotheobromae* S10 and *P. mangiferae* MN2 were re-isolated, confirming Koch's postulates.

DISCUSSION

The fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* has been reported as the causative agent of mango dieback individually and as fungal complexes in various parts of the world such as Brazil, Egypt, Peru, Korea, and Australia, among others (Sakalidis *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2017; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). In Mexico, the presence of *L. pseudotheobromae* has been associated with the death of mango trees of the Tommy Atkins and Ataulfo varieties in the states of Colima, Guerrero, Jalisco and Michoacán (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). The present study reports for the first time the presence of *L.*

tratamientos de coinfección e infección individual se presentaron diferencias significativas en área de lesión. En la coinfección el área de lesión fue mayor en comparación cuando fueron inoculaciones individuales (Cuadro 2). En la coinfección se ve de manera clara el aumento en el área de lesión aumenta significativamente. Las ramas control no presentaron área de lesión, no se observó la presencia de gomosis síntoma característico de la muerte descendente. A partir de cada rama se obtuvo tejido necrosado y fueron re-aisladas las especies de *L. pseudotheobromae* S10 y *P. mangiferae* MN2, confirmando los postulados de Koch.

DISCUSIÓN

El hongo *Lasiodiplodia pseudotheobromae* ha sido reportado como el agente causal de la muerte descendente en mango de manera individual y en forma de complejos en diversas partes del mundo como: Brasil, Egipto, Perú, Corea, Australia, entre otros (Sakalidis *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2017; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). En México, la presencia de *L. pseudotheobromae*, se ha asociado a la muerte de árboles de mango en

Table 2. Coinfection of *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10 in mango branches after 5 days.
Cuadro 2. Coinfección de *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10 en ramas después de 5 días.

Tratamiento	Área de lesión (mm ²) ^y
Control (PDA)	0.0±0.1 ^a
<i>L. pseudotheobromae</i> S10 individual	24.7±3.7 ^b
<i>P. mangiferae</i> MN2 individual	2.7±1.2 ^a
<i>L. pseudotheobromae</i> S10 + <i>P. mangiferae</i> MN2 coinfección	39.3±2.5 ^c

^y Each value represents the mean ± standard deviation. / ^y Cada valor representa la media ± desviación estándar.

^z Means with different letters are statistically different (Tukey, p≤0.05). / ^z Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

pseudotheobromae in mango trees var. Manila with dieback symptoms in Veracruz. In recent years, the importance of the genus *Pestalotiopsis* has increased due to the damage it causes to plants of commercial importance such as peach and blueberry plants (Chen *et al.*, 2012; Borrero *et al.*, 2018; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020). In mango, *P. mangiferae* has been associated with leaf spot (Rakesh *et al.*, 2020). However, so far it has not been reported as part of the complex that causes dieback, unlike other species of the genus such as *P. theae* (de-Oliveira *et al.*, 2010; Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). The present study provides the first report of *P. mangiferae* as part of the complex causing dieback in mango var. Manila.

In different ecosystems, plants interact with multiple groups of microorganisms, including phytopathogenic fungi, which interact with each other forming different ecological relationships (Liu *et al.*, 2019). Although there are various reports on phytopathogenic fungi that associate to form complexes and cause diseases in various crops, little is known about their interaction and the mutual effect they have on their growth (Abdullah *et al.*, 2017; 2018). The results of the present study using dual culture suggest a neutral interaction between *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae* when hyphal crossing is observed instead of an area of antagonism. The results coincide with those that were previously reported on the interaction between *Seimatosporium vitifusiforme* and *Diplodia seriata* in grapevines. (Lawrence *et al.*, 2018). The interaction between fungi in a particular space and time could give rise to the formation of complexes that cause diseases in various plants, including dieback in mango (Junaid *et al.*, 2020).

Various phytopathogenic fungi produce antifungal compounds, such as phenols, terpenes, and flavonoids, which can inhibit the growth of various microorganisms, including fungi. This has been used as a biotechnological control strategy

las variedades Tommy Atkins y Ataulfo en Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). Este estudio reporta por primera vez a *L. pseudotheobromae* en árboles de mango var. Manila con síntomas de muerte descendente en Veracruz. Por otra parte, en los últimos años la importancia del género *Pestalotiopsis* se ha incrementado debido a los daños que ocasiona en plantas como melocotón y arándanos (Chen *et al.*, 2012; Borrero *et al.*, 2018; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020). En mango, *P. mangiferae* se ha asociado con la mancha foliar (Rakesh *et al.*, 2020), sin embargo, hasta el momento no ha sido reportado como parte del complejo causante de la muerte descendente, a diferencia de otras especies del género como *P. theae* (de-Oliveira *et al.*, 2010; Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). Nuestro estudio aporta el primer reporte de *P. mangiferae* como parte del complejo causante de la muerte descendente en el cultivo de mango var. Manila.

En los diferentes ecosistemas las plantas interactúan con múltiples grupos de microorganismos incluyendo a los hongos fitopatógenos, los cuales, interactúan entre sí formando diferentes relaciones ecológicas (Liu *et al.*, 2019). Aunque existen diversos reportes sobre hongos fitopatógenos que se asocian para formar complejos y causar enfermedades en diversos cultivos, poco se conoce acerca de su interacción y el efecto entre ellos sobre su crecimiento (Abdullah *et al.*, 2017; 2018). Los resultados de este estudio del cultivo dual sugieren una interacción neutral *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*, al observarse cruzamiento de hifas y no un área de antagonismo, coincidiendo los resultados con lo reportado durante la interacción entre *Seimatosporium vitifusiforme* y *Diplodia seriata* en la vid (Lawrence *et al.*, 2018). La interacción entre hongos en un espacio y tiempo definido podría dar origen a la formación de complejos que causan enfermedades en diversas plantas incluyendo la muerte descendente en mango (Junaid *et al.*, 2020).

(Nalin *et al.*, 2019; Reveglia *et al.*, 2020). In the present study, the filtrate of *L. pseudotheobromae* S10 significantly inhibited *P. mangiferae* MN2. There are various reports of species of the genus *Lasiodiplodia* that produce mellein, an antifungal phenolic compound that causes cell lysis, inhibiting conidia germination and mycelial growth in various fungi (Qian *et al.*, 2014; Cimmino *et al.*, 2017; Morales-Sánchez *et al.*, 2021) such as *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva* and *Lasiodiplodia theobromae* (Wang *et al.*, 2014; Abro *et al.*, 2019). Studies of fungal filtrates focused on the control of phytopathogens could provide useful alternatives if their active compounds, metabolic production, fungicidal and/or fungistatic capacity, among others, are characterized (Pradeep *et al.*, 2013). This deserves special attention since the dual culture assay showed no evidence of antagonism. This could be attributed to an increase in the production of antifungal metabolites in liquid culture medium compared to the solid culture medium, as has been observed in other species (Pradeep *et al.*, 2013). Another probable explanation could be the decrease or suppression from metabolites of *L. pseudotheobromae* when it recognizes *P. mangiferae*. The development in solid medium and in the branches was the same, corroborating the interaction between both species. The present study opens an opportunity to address the importance of secondary metabolites produced during interaction with various dieback-causing species.

In recent years, various studies have focused on investigating plant diseases caused by co-infections of phytopathogenic fungi and their interactions with the host (Susi *et al.*, 2015; Lerch-Olson and Robertson, 2020; Hoffmann *et al.*, 2021). Mango branches co-inoculated with *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae* exhibited greater severity of dieback overall compared to individual infections. Fungal interactions are complex and involve

Diversos hongos fitopatógenos producen compuestos antifúngicos como fenoles, terpenos y flavonoides capaces de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos incluidos los hongos lo que se ha utilizado como estrategia biotecnológica de control (Nalin *et al.*, 2019; Reveglia *et al.*, 2020). En nuestro estudio, el filtrado de *L. pseudotheobromae* S10 inhibió significativamente a *P. mangiferae* MN2. Existen diversos reportes donde especies del género *Lasiodiplodia* producen melleína, compuesto fenólico antifúngico que provoca lisis celular, inhibiendo la germinación de conidios y el crecimiento micelial de diversos hongos (Qian *et al.*, 2014; Cimmino *et al.*, 2017; Morales-Sánchez *et al.*, 2021), como *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva* y *Lasiodiplodia theobromae* (Wang *et al.*, 2014; Abro *et al.*, 2019). Los estudios de los filtrados de hongos enfocados al control de fitopatógenos pueden ser una alternativa si se caracterizan sus compuestos activos, producción metabólica, su capacidad fungicida y/o fungistático, entre otros (Pradeep *et al.*, 2013). Esto resulta de especial atención, pues en los cultivos duales no se observó ningún aspecto de antagonismo, esto podría atribuirse un aumento en la producción de metabolitos antifúngicos en medio de cultivo líquido en comparación de sólido como se ha observado en otras especies (Pradeep *et al.*, 2013). Otra probable explicación podría añadirse a la disminución o supresión de metabolitos de *L. pseudotheobromae* cuando reconoce a *P. mangiferae*. Así mismo el desarrollo en medio sólido y en ramas fue el mismo corroborando la interacción entre ambas especies. Esta investigación abre una oportunidad para abordar los metabolitos secundarios producidos durante la interacción con diversas especies causantes de la enfermedad de la muerte descendente.

En los últimos años, diversos estudios se han enfocado a investigar las enfermedades vegetales provocadas por co-infecciones de hongos fitopatógenos

processes of mutualism, antagonism, coexistence, among others (Fang *et al.*, 2021). In addition, the severity of diseases caused by co-infections of phytopathogens depends on various factors, mainly growth rate, virulence, metabolite production, interactions, host, among others (Müller *et al.*, 2012; Boddy, 2016; Luo *et al.*, 2017). Future studies will aim to analyze the fungal-host pathosystem and develop integrated management strategies for dieback.

CONCLUSIONS

The present study provides the first report of the causal agents associated with dieback in Manila mango trees in the state of Veracruz. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* were morphologically and molecularly identified based on the results obtained in the field and in the laboratory. In co-infection, the disease lesion area was larger in branches co-inoculated with *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*, compared to individual infections. *P. mangiferae* filtrates had no effect on the growth of *L. pseudotheobromae*, while *L. pseudotheobromae* filtrates had an inhibitory effect on *P. mangiferae* growth.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to the Mango Product System (Sistema Producto Mango) of the state of Veracruz, in particular to Ing. Guillermo Palmeros Marín. To the Universidad Veracruzana for financing this project through the UN 2030 Agenda for Sustainable Development with the project "Alternatives for production management through biological control of phytopathogenic fungi that cause the decline of mango trees in Actopan,

y sus interacciones con el hospedero (Susi *et al.*, 2015; Lerch-Olson y Robertson, 2020; Hoffmann *et al.*, 2021). Las ramas de mango co-inoculadas con *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae* presentaron una mayor severidad de la muerte descendente en conjunto en comparación con las infecciones individuales. Las interacciones fúngicas son complejas e involucran procesos de mutualismo, antagonismo, coexistencia, entre otros (Fang *et al.*, 2021). Además, la severidad de las enfermedades provocadas por co-infecciones de fitopatógenos depende de diversos factores, destacando la tasa de crecimiento, virulencia, producción de metabolitos, interacción, hospedero, entre otros (Müller *et al.*, 2012; Boddy, 2016; Luo *et al.*, 2017). A futuro se propone investigar el patosistema hongos-hospedero y desarrollar estrategias de manejo integrado de la muerte descendente.

CONCLUSIONES

Este estudio aporta el primer reporte de los agentes causales asociados a la muerte descendente en mango var. Manila en el estado de Veracruz. A partir de los resultados obtenidos en campo y en laboratorio, se identificó de manera morfológica y molecular a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae*. En la co-infección el área de lesión de la enfermedad fue mayor en las ramas co-inoculadas con *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*, en comparación con las infecciones individuales. Los filtrados de *P. mangiferae* no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *L. pseudotheobromae*, mientras que los filtrados de *L. pseudotheobromae* tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. mangiferae*.

Veracruz. To the National Council of Science and Technology (CONACyT) for the scholarship granted number 764501.

CITED LITERATURE

- Abdullah AS, Moffat CS, Lopez-Ruiz FJ, Gibberd MR, Hamblin J, and Zerihun A. 2017. Host–multi-pathogen warfare: Pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>
- Abdullah AS, Turo C, Moffat CS, Lopez-Ruiz FJ, Gibberd MR, Hamblin J, and Zerihun A. 2018. Real-time PCR for diagnosing and quantifying co-infection by two globally distributed fungal pathogens of wheat. *Frontiers in Plant Science* 1086. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01086>
- Abro MA, Sun X, Li X, Jatoi GH and Guo LD. 2019. Biocontrol potential of fungal endophytes against *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum causing wilt in cucumber. *The Plant Pathology Journal* 235(6):598-608. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2019.0129>
- Al-Adawi A, Deadman M, Al-Rawahi A, Al-Maqbali Y, Al-Jahwari A, Al-Saadi B, Al-Amri I, and Wingfield M. 2006. Aetiology and causal agents of mango sudden decline disease in the Sultanate of Oman. *European Journal of Plant Pathology* 116(4): 247-254. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9056-x>
- Al-Saadoon, AH, Ameen M, Hameed M, and Al-Badran A. 2012. Histopathology of grapevine inoculated with *Lasiodiplodia theobromae*. *Basrah Journal of Agricultural Sciences* 25(1):1-12. <https://doi.org/10.33762/bagrs.2012.54726>
- Altendorf S. 2019. Major tropical fruits market review. 2017. Rome, FAO. 10 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Boddy, L. 2016. Chapter 10—Interactions between fungi and other microbes. En S. C. Watkinson, L. Boddy, y N. P. Money (Eds.), *The Fungi* (Third Edition). Academic Press. pp. 337-360. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00010-4>
- Borrero C, Castaño R and Avilés M. 2018. First report of *Pestalotiopsis clavispورا* (*Neopestalotiopsis clavispورا*) causing canker and twig dieback on blueberry bushes in Spain. *Plant Disease* 102(6), 1178-1178. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1529-PDN>
- Chen F, Lu L, Ni H, Wang Y, Wang Y and Li G. 2012. First report of *Pestalotiopsis mangiferae* and *P. vismiae* causing twig dieback of *Myrica rubra* in China. *Plant Disease* 96(4): 588-588. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1054-PDN>
- Cimmino A, Cinelli T, Masi M, Reveglia P, da-Silva MA, Mugnai L, Michereff SJ, Surico G, and Evidente A. 2017. Phytotoxic lipophilic metabolites produced by grapevine strains of *Lasiodiplodia* species in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(6): 1102-1107. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04906>
- Clendenin I. 1896. *Lasiodiplodia* E. and E., n. gen. *Botanical Gazette* 21(2): 92-92. <https://doi.org/10.1086/327307>
- de-Oliveira CVS, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG and Câmara MPS. 2010. Species of

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Sistema Producto Mango del estado de Veracruz en particular al Ing. Guillermo Palmeros Marín. A la Universidad Veracruzana por el financiamiento de este proyecto a través de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible de la ONU con el proyecto “Alternativas para el manejo de la producción a través del control biológico de hongos fitopatógenos causantes del declive de árboles de mango en Actopan, Veracruz”. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada número 764501.

Fin de la versión en Español

- Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 127(4): 509-519. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9616-y>
- Elqassas R, and Abu-Naser SS. 2018. Expert system for the diagnosis of mango diseases. *International Journal of Academic Engineering Research* 2(8): 10-18
- Fan S, Huang Y, Zhang X, Chen G, Zhou J, Li X, and Han M. 2019. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing canker on *Cotinus coggygria* in China. *Plant Disease* 103(10): 2678-2678. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0690-PDN>
- Fang X, Zhang C, Wang Z, Duan T, Yu B, Jia X, Pang J, Ma L, Wang Y, and Nan Z. 2021. Co-infection by soil-borne fungal pathogens alters disease responses among diverse alfalfa varieties. *Frontiers in Microbiology* 12: 664385-664385. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664385>
- Hajieghrari B, Torabi-Giglou M, Mohammadi MR, and Davari M. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology* 7(8). <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Hoffmann A, Lischeid G, Koch M, Lentzsch P, Sommerfeld T, and Müller MEH. 2021. Co-cultivation of *Fusarium*, *Alternaria*, and *Pseudomonas* on wheat-Ears affects microbial growth and mycotoxin production. *Microorganisms* 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020443>
- Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous PW, Groenewald JZ and Lombard L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology* 41(6): 649-660. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0163-1>
- Jackson DSM and Johnson-Cicalese J. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology* 78 237-239. <https://doi.org/10.1094/Phyto-78-237>

- Junaid M, Purwantara A and Guest D. 2020. First report of vascular streak dieback symptom of cocoa caused by *Ceratobasidium theobromae* in Barru District, South Sulawesi. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 486(1): 012170. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/486/1/012170/pdf>
- Khaskheli M, Jiskani M, Soomro M, Talpur M and Poussio G. 2011. Prevalence of mango Sudden decline/death syndrome (MSDS) on various varieties at the orchards of different age in the Vicinity of Tando Qaiser, Hyderabad, Sindh. Pakistan Journal of Agriculture Agricultural Engineering and Veterinary Sciences 27(2): 160-167
- Kim H, Castellon-Chicas MJ, Arbizu S, Talcott S, Drury NL, Smith S and Mertens-Talcott S. U. 2021. Mango (*Mangifera indica* L.) Polyphenols: Anti-Inflammatory Intestinal Microbial Health Benefits, and Associated Mechanisms of Actions. Molecules 26(9): 2732. <https://doi.org/10.3390/molecules26092732>
- Kwon JH, Choi O, Kang B, Lee Y, Park J, Kang DW, Han I and Kim J. 2017. Identification of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing mango dieback in Korea. Canadian Journal of Plant Pathology 39(2): 241-245. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1329231>
- Lawrence DP, Travadon R, and Baumgartner K. 2018. Novel *Seimatosporium* species from grapevine in northern California and their interactions with fungal pathogens involved in the trunk-disease complex. Plant Disease 102(6): 1081-1092. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1247-RE>
- Lee SB. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press. 282-7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X>
- Lerch-Olson ER and Robertson AE. 2020. Effect of co-inoculations with *Pythium* and *Fusarium* species on seedling disease development of soybean. Canadian Journal of Plant Pathology 42(3): 408-418. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1668858>
- Li L, Mohd MH, Mohamed NN, Subramaniam S and Latiffah Z. 2021. Identification of Botryosphaeriaceae associated with stem-end rot of mango (*Mangifera indica*) in Malaysia. Journal of Applied Microbiology 130(4): 1273-1284. <https://doi.org/10.1111/jam.14828>
- Liu H, Macdonald CA, Cook J, Anderson IC and Singh BK. 2019. An ecological loop: host microbiomes across multitrophic interactions. Trends in Ecology and Evolution 34(12): 1118-1130. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.011>
- Luo F, Zhong Z, Liu L, Igarashi Y, Xie D and Li N. 2017. Metabolomic differential analysis of interspecific interactions among white rot fungi *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens* and *Pleurotus ostreatus*. Scientific Reports 7(1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05669-3>
- Manter DK and Vivanco JM. 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. Journal of Microbiological Methods 71(1): 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.016>
- Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J and Crous PW. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. Studies in Mycology 79: 121-186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Marques MW, Lima NB, de-Morais MA, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ, Phillips AJL and Câmara MPS. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. Fungal Diversity 61(1): 181-193. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0231-z>
- Morales-Sánchez V, Díaz CE, Trujillo E, Olmeda SA, Valcarcel F, Muñoz R and González-Coloma A. 2021. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. SPH2. Journal of Fungi 7(2):109. <https://doi.org/10.3390/jof7020109>
- Müller M, Steier I, Köppen R, Siegel D, Proske M, Korn U and Koch M. 2012. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. Journal of Applied Microbiology 113(4): 874-887. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05388.x>
- Nalin Rathnayake GR, Savitri KN, Jayasinghe L, Araya H and Fujimoto Y. 2019. Secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. Natural Products and Bioprospecting 9(6): 411-417. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-00225-0>
- Naglot A, Goswami S, Rahman I, Shrimali DD, Yadav KK, Gupta VK, Rabha AJ, Gogoi HK and Vee V. 2015. Antagonistic potential of native *Trichoderma viride* strain against potent tea fungal pathogens in North East India. The Plant Pathology Journal 31(3): 278-289. PubMed. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2015.0004>
- Orton ES and Brown JKM. 2016. Reduction of growth and reproduction of the biotrophic fungus *Blumeria graminis* in the presence of a necrotrophic pathogen. Frontiers in Plant Science 7: 742. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00742>
- Pradeep FS, Begam MS, Palaniswamy M and Pradeep BV. 2013. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. World Applied Sciences Journal 22(1):70-77. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.22.01.7265>
- Qian CD, Fu YH, Jiang FS, Xu ZH, Cheng DQ, Ding B, Gao CX and Ding ZS. 2014. *Lasiodiplodia* sp. ME4-2, an endophytic fungus from the floral parts of *Viscum coloratum*, produces indole-3-carboxylic acid and other aromatic metabolites. BMC Microbiology 14: 297. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0297-0>
- Qian YX, Kang JC, Luo YK, Yang XB, He J and Wang L. 2021. Secondary metabolites from endophytic *Pestalotiopsis microspora* and their P-Glycoprotein inhibitory activity. Chemistry of Natural Compounds 57(5): 924-926. <https://doi.org/10.1007/s10600-021-03513-9>
- Rakesh A, Mishra JP, Prasad R, Sekhar JC, Gupta D, Reddy VP and Kumar S. 2020. Isolation and *in vitro* evaluation of fungicides against *Pestalotiopsis mangiferae* causing grey blight of mango. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 9(4): 1368-1370. <https://www.phytojournal.com/archives/2020/vol9issue4/PartS/9-4-145-386.pdf>
- Reveglia P, Masi M and Evidente A. 2020. Melleins-Intriguing natural compounds. Biomolecules 10(5): 772. <https://doi.org/10.3390/biom10050772>
- Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW and Alves A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of

- Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology* 121(4): 452-465. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- Rodríguez-Gálvez E, Hilário S, Lopes A and Alves A. 2020. Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. *European Journal of Plant Pathology* 157(1): 89-102. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01983-1>
- Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GE and Burgess TI. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130(3): 379-391. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9760-z>
- Salvatore MM, Alves A and Andolfi A. 2020. Secondary metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, chemical diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Toxins* 12(7): 457. <https://doi.org/10.3390/toxins12070457>
- Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas JS, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M and Silva-Rojas H. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica*). *Agrociencia* 47(1): 61-73. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n1/v47n1a6.pdf>
- Santos J, Hilário S, Pinto G and Alves A. 2021. Diversity and pathogenicity of pestalotioid fungi associated with blueberry plants in Portugal, with description of three novel species of *Neopestalotiopsis*. *European Journal of Plant Pathology* 162(3): 39-555. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02419-0>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). 2020. El rey de las frutas tropicales: Mango. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-rey-de-las-frutas-tropicales-mango>
- Singh HB. 2006. *Trichoderma*: A boon for biopesticides industry. *J Mycology Plant Pathology* 36: 373-384
- Susi H, Barrès B, Vale PF and Laine AL. 2015. Co-infection alters population dynamics of infectious disease. *Nature Communications* 6: 5975. <https://doi.org/10.1038/ncomms6975> (2015)
- Swaroop A, Bagchi M, Moriyama H and Bagchi D. 2018. Health Benefits of mango (*Mangifera indica*) and mangiferin. *Japan Journal of Medicine* 1(2):149-154. <https://japanjournalofmedicine.com/health-benefits-of-mango-mangiferaindica-l-and-mangiferin/>
- Tollenaere C, Susi H and Laine AL. 2016. Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends in Plant Science* 21(1): 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.014>
- Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, Guevara J and Gubler WD. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92(4): 519-529. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0519>
- Wang J, Wang G, Zhang Y, Zheng B, Zhang C and Wang L. 2014. Isolation and identification of an endophytic fungus *Pezizula* sp. in *Forsythia viridissima* and its secondary metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(10): 2639-2644. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1686-0>

Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*

Análisis genético de la resistencia a fungicidas en *Fusarium oxysporum* asociado a *Vanilla planifolia*

Nelly Abigail González-Oviedo, Lourdes Georgina Iglesias-Andreu, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101, Col. Emiliano Zapata, CP 91090, Xalapa, Veracruz, México; Felipe Roberto Flores-de la Rosa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias CIR Golfo Centro, Campo Experimental Ixtacuaco, Km 4.5 carretera federal Martínez de la Torre – Tlapacoyan, Cong. Rojo Gómez, CP 93650, Tlapacoyan, Veracruz, México; Andrés Rivera-Fernández, Mauricio Luna-Rodríguez*, Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Lomas del Estadio s/n, CP 91000, Xalapa, Veracruz, México.

*Corresponding author: mluna@uv.mx

Received: March 15, 2022.

Accepted: June 26, 2022.

González-Oviedo NA, Iglesias-Andreu LG, Flores-de la Rosa FR, Rivera-Fernández A and Luna-Rodríguez M. 2022. Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 330-348.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-3>

First DOI publication: July 15, 2022.

Primera publicación DOI: 15 de Julio, 2022.

Abstract. *Vanilla planifolia* is attacked by the fungus *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Since there are no resistant genotypes available to producers, they opt for the use of synthetic fungicides to control the disease, however, there is no information on a possible resistance of the pathogen to these commercial fungicides. The goal of the work was to analyze the response of *F. oxysporum* strains,

Resumen. *Vanilla planifolia* es atacada por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Dado que no existen genotipos resistentes disponibles para los productores, éstos optan por el uso de fungicidas sintéticos para su control; sin embargo, no hay información sobre la respuesta del patógeno a estos productos comerciales. El objetivo del trabajo fue analizar la respuesta de cepas de *F. oxysporum*, patógenas (nueve) y no patógenas (tres) de *V. planifolia*, a tres bencimidazoles (tiofanato metílico, benomilo y carbendazim) y a clorotalonil, así como las bases genéticas de la respuesta al fungicida mediante el estudio de las proteínas blanco de los mismos, la β -tubulina y la GPDH, respectivamente. Se observó que las 12 cepas estudiadas fueron susceptibles a los fungicidas benomilo y carbendazim, mientras que 11 de ellas fueron resistentes al tiofanato metílico y nueve al clorotalonil. No se encontraron diferencias entre el carácter patogénico o la

pathogenic (nine) and non-pathogenic (three) of *V. planifolia*, to three fungicides of the benzimidazole family and to chlorothalonil, as well as the genetic bases by studying the target proteins of these active ingredients, β -tubulin and GPDH. It was observed that the 12 strains studied were susceptible to the fungicides benomyl and carbendazim, while 11 of them were resistant to thiophanate methyl and nine to chlorothalonil. No relationship was found between the pathogenic character or the origin of the strains and the susceptibility to fungicides. It was found that resistance to thiophanate methyl is not conferred by a point mutation of the β -tubulin coding sequence, as previously hypothesized; apparently, it could be more related to the absence of protein motifs. No relationship was observed between variation in the gene GPDH with the resistance or susceptibility of the strains.

Keywords: Vanilla, root rot, stem rot, GPDH, β -tubulin.

Vanilla (*Vanilla planifolia*) is an orchid with important commercial value due to the compound vanillin, that it produces. Vanillin is sought after by various industries for its aroma and flavor. This crop faces a significant threat from the disease known as “root and stem rot”, which is caused by the ascomycete *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2015). However, it has been shown that vanilla is associated with multiple genotypes of *F. oxysporum* that do not necessarily behave as pathogens (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017). This also happens with other plant species, which has led to subdividing them into pathogenic (*formae speciales*) and beneficial endophytes to avoid losing valuable genetic information that could help understand the nature of this pathogen (Lecomte *et al.*, 2016).

procedencia de las cepas en relación con la susceptibilidad a los fungicidas. Se encontró que la resistencia al tiofanato metílico no es otorgada por una mutación puntual de la secuencia codificante de la β -tubulina, como se ha hipotetizado anteriormente; al parecer, pudiera estar más relacionada con la ausencia de motivos de la proteína. No se observó relación entre variación del gen GPDH con la resistencia o susceptibilidad de las cepas.

Palabras clave: Vainilla, pudrición de raíz, pudrición de tallo, GPDH, β -tubulina.

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es una orquídea de alto valor comercial debido a que produce el compuesto vainillina. La vainillina es buscada por varias industrias por su aroma y sabor. Este cultivo enfrenta una importante amenaza por la enfermedad conocida como “pudrición de raíz y tallo” causada por el ascomicete *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la vainilla está asociada a múltiples genotipos de *F. oxysporum*, sin necesidad de que todos se comporten como patógenos (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017). Lo anterior, sucede también con otras especies vegetales, lo que ha llevado a subdividirlos en patogénicos (*formae speciales*) y endófitos benéficos, buscando de esta forma evitar perder valiosa información genética que ayude a entender la naturaleza del patógeno (Lecomte *et al.*, 2016).

Al no existir genotipos de vainilla resistentes al alcance de los productores mexicanos, éstos buscan alternativas para el control de la enfermedad, siendo el control químico mediante fungicidas el principal método utilizado, sobre todo en la principal región productora de Papantla, Veracruz (Hernández-Hernández, 2011), zona considerada como el centro de origen, domesticación y distribución de

Since there are no resistant vanilla genotypes available to Mexican producers, they seek alternatives to control the disease, the main one being chemical control based on the use of fungicides. The main vanilla-producing region is Papantla, in the state of Veracruz (Hernández-Hernández, 2011), an area considered to be the center of origin, domestication and distribution of vanilla (Lubinsky *et al.*, 2008). The chemical control of Fusarium wilt in vanilla is performed mainly with fungicides of the benzimidazole group (Hernández-Hernández, 2019). These fungicides directly affect the degradation of β -tubulin in microtubules, thus inhibiting fungal cell division (Zhang *et al.*, 2015). Other fungicides suggested for the control of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* are broad-spectrum ones, such as chlorothalonil, of the carbamate group, which have multiple sites of action in fungal cells, including the enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), involved in glycolysis, which, when inactivated, causes the death of the fungus (Long and Siegel, 1975; Baćmaga *et al.*, 2018).

In the case of benzimidazoles, numerous cases of resistance have been reported in various *formae speciales* of *F. oxysporum* (Arie, 2019), which have previously been associated with a point mutation at position 200 of the encoding sequence of β -tubulin (Petkar *et al.*, 2017). For this reason, it is crucially important to determine the real susceptibility of *F. oxysporum* isolates to these fungicides, before using to control these pathogens. The present study aimed to evaluate the effect of three fungicides of the benzimidazole group and chlorothalonil on pathogenic and non-pathogenic strains of *F. oxysporum* associated with *Vanilla planifolia*. An additional aim was to determine whether resistance in strains of this *forma specialis* is related to point mutations in the sequences of the target proteins, β -tubulin and glycerol-3-phosphate dehydrogenase.

la vainilla (Lubinsky *et al.*, 2008). El control químico de la fusariosis en la vainilla se lleva a cabo principalmente con fungicidas de la familia de los bencimidazoles (Hernández-Hernández, 2019). Estos fungicidas inciden directamente en la degradación de la β -tubulina de los microtúbulos, inhibiendo de esta forma la división celular fúngica (Zhang *et al.*, 2015). Otros sugeridos para el control de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* son los fungicidas de amplio espectro, como el clorotalonil, perteneciente a la familia de los carbamatos, los cuales tienen múltiples sitios de acción en las células del hongo, entre ellas la enzima glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa (GPDH) involucrada en la glucólisis, que al inactivarse ocasiona la muerte del hongo (Long y Siegel, 1975; Baćmaga *et al.*, 2018).

Sin embargo, en el caso de los bencimidazoles, se han reportado numerosos casos de generación de resistencia en diversas *formae speciales* de *F. oxysporum* (Arie, 2019), la cual ha sido previamente asociada a una mutación puntual en la posición 200 de la secuencia codificante de la proteína β -tubulina (Petkar *et al.*, 2017), por tal razón es de suma importancia determinar la susceptibilidad real de aislados de *F. oxysporum* a estos fungicidas, antes de ser utilizados para el control de estos patógenos. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de tres fungicidas de la familia de los bencimidazoles y el clorotalonil en cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de *Vanilla planifolia*, además de determinar si la resistencia en cepas de esta *forma specialis* está relacionada con mutaciones puntuales en las secuencias de las proteínas blanco, β -tubulina y glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *F. oxysporum*. Para el presente estudio se utilizaron 12 cepas de *F. oxysporum* aisladas de

MATERIALS AND METHODS

Strains of *F. oxysporum*. Twelve strains of *F. oxysporum* isolated from vanilla were used in the present study: nine strains that are pathogenic for *V. planifolia* and three non-pathogenic ones (Table 1). Except for strains BC1, Chic3 and JF9, the identification (morphological and molecular) and pathogenic capacity of the other strains were reported in the works of Adame-García *et al.* (2015), Casillas-Isiordia *et al.* (2017) and Flores-de la Rosa *et al.* (2018). The morphological and genetic properties of the strains BC1, Chic3 and JF9, and pathogenic capacity against *V. planifolia*, were evaluated following the protocols described in the aforementioned references (data not shown). All the strains are preserved in the Laboratory of Genetic and Plants-Microorganisms Interactions of the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Veracruzana. The vanilla plants from which the fungi were obtained were collected

vainilla: nueve patógenas de *V. planifolia* y tres no patógenas (Cuadro 1). Con excepción de las cepas BC1, Chic3 y JF9, la identificación (morfológica y molecular) y capacidad patogénica de las cepas restantes se encuentra publicada en los trabajos de Adame-García *et al.* (2015), Casillas-Isiordia *et al.* (2017) y Flores-de la Rosa *et al.* (2018). La evaluación morfológica, genética y capacidad patogénica en *V. planifolia* de las cepas BC1, Chic3 y JF9 fueron determinadas siguiendo los protocolos descritos en las referencias antes mencionadas (datos no mostrados). Todas las cepas están resguardadas en el Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana. Las plantas de vainilla de donde se obtuvieron los hongos fueron colectadas de acahuales, selva o plantaciones de vainilla, sin manejo con fungicidas químicos.

Preparación de suspensión de esporas. Las cepas se activaron y posteriormente se subcultivaron en

Table 1. Origin and susceptibility to benzimidazoles and chlorothalonil of strains of *F. oxysporum* (pathogenic and non-pathogenic) isolated from *V. planifolia*.
Cuadro 1. Procedencia y susceptibilidad a bencimidazoles y clorotalonil, de cepas de *Fusarium oxysporum* (patógenas y no patógenas) aisladas de *Vanilla planifolia*.

ID Cepa	Procedencia	Carácter	Fuente	Benomilo	Carbendazim	Tiofanato metílico	Clorotalonil
H5	Veracruz	Patógeno	1	S	S	R	R
H9	Veracruz	Patógeno	1	S	S	R	R
JF5	Veracruz	Patógeno	3	S	S	R	R
A3	Veracruz	Patógeno	3	S	S	R	R
V6M2	Veracruz	Patógeno	3	S	S	R	R
JF9	Veracruz	No Patógeno	4	S	S	S	S
N12	Nayarit	Patógeno	2	S	S	R	R
N3	Nayarit	Patógeno	2	S	S	R	R
BC1	Nayarit	No Patógeno	4	S	S	R	R
Chic 2	Oaxaca	Patógeno	3	S	S	R	R
Chic 6	Oaxaca	No Patógeno	3	S	S	R	S
Chic 3	Oaxaca	No Patógeno	4	S	S	R	S

S= susceptible; R= resistant. Source: 1) Adame-García *et al.* 2015; 2) Casillas-Isiordia *et al.* 2017; 3) Flores de la Rosa *et al.* 2018; 4) Present study. / S= susceptible; R= resistente. Fuente: 1) Adame-García *et al.* 2015; 2) Casillas-Isiordia *et al.* 2017; 3) Flores de la Rosa *et al.* 2018; 4) este estudio.

from secondary forests (acahuales), jungle or vanilla plantation areas untreated with chemical fungicides.

Preparation of spore suspension. The strains were activated and subsequently subcultured on PDA for 10 days at 25 °C in a microbiological incubator (Felisa). At the end of the incubation period, 5 mL of sterile distilled water with three drops of Tween 20 were added to the culture medium. A suspension sample of mycelium and conidia was then transferred to 15 mL conical tubes and centrifuged at 1000 rpm for 2 min. Conidia suspensions of 1×10^9 CFU were prepared by diluting the supernatant with sterile distilled water. The spore count was performed using a Neubauer chamber and microscopic observation.

Fungicide resistance tests. The present study evaluated the susceptibility of twelve strains of *F. oxysporum* to four commercial fungicides: thiophanate methyl (Cercobin M[®]), benomyl (Promyl[®]), carbendazim (Prozycar[®]), and chlorothalonil (Talonil 75[®]). The tests were carried out in Petri dishes using the hole-plate method, for which fungal cultures were prepared with 100 µL of the 1×10^9 CFU spore suspension and 25 mL of PDA. For this, the spore suspension was placed directly on the base of the Petri dish. Subsequently, ~ 25 mL of culture medium were poured on top at a temperature of ~ 40 °C. The conidia were spread into the agar plate with circular movements before the solidification of the culture medium. After solidification of the agar, a sterile hollow metal rod (a hollow punch) was used to cut out four cylindrical blocks of agar from equidistantly distributed points. Three concentrations of each type of fungicide were then introduced into the remaining holes: one according to the recommendations of the manufacturer (1% P:V), a higher one (2.5% P:V)

PDA durante 10 días a 25 °C en incubadora microbiológica (Mca. Felisa). Concluido el periodo de incubación se adicionaron 5 mL de agua destilada estéril con tres gotas de Tween 20 sobre el medio de cultivo para transferir una muestra de suspensión de micelio y conidias a tubos cónicos de 15 mL, para centrifugación a 1000 rpm durante 2 min. A partir del sobrenadante se prepararon suspensiones de conidias de 1×10^9 UFC por dilución con agua destilada esterilizada. Para el conteo de esporas se utilizó una cámara de Neubauer y observación microscópica.

Pruebas de resistencia a fungicidas. Se evaluó la susceptibilidad de las 12 cepas de *F. oxysporum* a cuatro fungicidas comerciales: tiofanato metílico (Cercobin M[®]), benomilo (Promyl[®]), carbendazim (Prozycar[®]) y clorotalonil (Talonil 75[®]). Las pruebas se llevaron a cabo en cajas de Petri mediante la técnica de placa-orificio, para ello, se prepararon cultivos fúngicos con 100 µL de la suspensión de esporas 1×10^9 UFC y 25 mL de PDA. Para ello, la suspensión de esporas se colocó directamente en la base de la caja de Petri y posteriormente, se vaciaron encima ~ 25 mL de medio de cultivo a una temperatura de ~ 40 °C. Las conidias fueron distribuidas en el agar con movimientos circulares a favor y en contra de las manecillas del reloj antes de la solidificación del medio de cultivo. Después de la solidificación del agar, con una varilla metálica hueca estéril (sacabocado) se removieron cuatro cilindros de agar distribuidos equidistantemente en la superficie de cada placa, donde se probaron tres concentraciones: una de acuerdo a la recomendación de uso del producto (1% P:V), una más alta (2.5% P:V) y una más diluida (0.5%), por cada tipo de fungicida. Para ello, en cada orificio se colocaron 10 µL de la solución del fungicida a la concentración evaluada. Como testigo, en uno de los orificios se colocaron 10 µL de agua destilada estéril.

and a more diluted one (0.5%). Ten microliters of the fungicide solution at the evaluated concentration were placed in each hole. As a control, 10 µL of sterile distilled water were placed in one of the holes. This test was repeated five times for each fungicide and for each strain of *F. oxysporum* under study. The cultures were incubated for five days at 25-26 °C in a microbiological incubator (Felisa). The diameter of the inhibition zone associated with each treatment was measured with a digital vernier. Resistant strains were identified by the absence of an inhibition halo around the hole into which the fungicide was placed.

Determination of the relationship between the pathogenic/non-pathogenic character of the *F. oxysporum* strain and its response to fungicides.

The possible relationship between the pathogenic or non-pathogenic character of the *F. oxysporum* strains and their susceptibility or resistance to fungicides, was determined using a Generalized Linear Model (Binomial Dist., Logit Link Function) based on a binary data matrix (0 resistant, 1 susceptible). A hierarchical and complete linkage cluster analysis was performed using Euclidean distance. All analyzes were performed using the statistical analysis software R 2.12.2.

DNA extraction. DNA was extracted, using a protocol based on the use of CTAB proposed by Adame-García et al. (2016a), from ~ 50 mg of mycelium of each isolate of *Fusarium oxysporum* after 10 to 14 days of growth in PDA medium. DNA was quantified with a compact UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One).

Design of primers for the GPDH gene. It was necessary to design primers to amplify the GPDH gene since no reports were found in the literature.

Esta prueba se repitió cinco veces por cada fungicida y por cada cepa de *F. oxysporum* en estudio. Los cultivos se incubaron durante cinco días a 25 - 26 °C en incubadora microbiológica (Mca. Felisa). El diámetro del halo de inhibición de cada tratamiento se midió con un vernier digital. Las cepas resistentes fueron aquellas en las que no se observó un halo de inhibición alrededor del orificio donde se depositó el fungicida.

Determinación de la relación entre el carácter patológico/no patológico de la cepa de *F. oxysporum*, con la respuesta a los fungicidas.

Para determinar la posible relación entre el carácter patológico y no patológico con la susceptibilidad o resistencia a los fungicidas, se aplicó un Modelo Lineal Generalizado (Dist. Binomial, Función de liga Logit) con base en una matriz de datos binarios (0 resistente, 1 susceptible). Asimismo, se realizó un análisis de conglomerados jerárquico y de ligamiento completo, empleando la distancia euclidiana. Los análisis se desarrollaron en el software para análisis estadísticos R 2.12.2.

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN se empleó un protocolo basado en el uso de CTAB propuesto por Adame-García et al. (2016a) a partir de ~ 50 mg de micelio de cada aislado de *Fusarium oxysporum* de 10 a 14 días de crecimiento en medio PDA. El ADN se cuantificó con un espectrofotómetro UV-Visible compacto (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One).

Diseño de iniciadores para el gen GPDH. Para la amplificación del gen GPDH fue necesario diseñar iniciadores por no encontrar reportes en la literatura. El diseño de los iniciadores consistió en buscar en NCBI, la secuencia de aminoácidos de la proteína GPDH entre las reportadas para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, posteriormente, convertir

The primers were designed by searching the NCBI database for the amino acid sequence of the GPDH protein among those reported for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The amino acid sequence was then converted into the corresponding nucleotide sequence using tBLASTn. The resulting sequence was searched for among the reported genomes of *F. oxysporum*. The sequences found were aligned using the Mega (Kumar *et al.*, 2018), Primer3 Plus (Untergasser *et al.*, 2007) and Primer-BLAST software packages, which yielded a total of 15 possible primer pairs (data not shown). Each primer pair was tested by *in silico* PCR on the NCBI platform. One of the selected primer pairs was P4f (5'-AAAGTCCACGCACTCCTCTG-3') and P4r (5'-AGAATGGCGACGGAAACCTT-3'), which was generated with the Primer3 Plus software and resulted in a sequence that extended from base 506 to 1146 of the total size of the gene. The other primer pair selected was P13f (5'-CCTGCACAAGTCAACAAGCC-3') and P13r (5'-GCGCAACTGTTGTCAACCAT-3'), generated with the Primers BLAST software and resulting in a sequence that extended from base 766 to 1710.

Amplification and sequencing of the β -tubulin and GPDH genes. The amplification of the β -tubulin gene was carried out with the primer set Tub1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') and Tub22 (5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3') (Nosratabadi *et al.*, 2018) under the following thermal conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, alignment for 45 s at 60 °C, extension for 80 s at 72 °C; and final extension at 72 °C for 7 min. The primer pairs P13f - P13r and P4f - P4r, designed in this study, were used for the amplification of the GPDH gene under the following thermal conditions: initial denaturation at 94 °C for 2 min; 35 cycles

de la secuencia en nucleótidos utilizando tBLASTn y posteriormente, se buscó la secuencia resultante en los genomas reportados de *F. oxysporum*. Las secuencias encontradas se alinearon en el software Mega (Kumar *et al.*, 2018) y mediante los softwares Primer3 Plus (Untergasser *et al.*, 2007) y Primer-BLAST que arrojaron un total 15 parejas de posibles iniciadores (datos no mostrados). Cada par de iniciadores arrojados se probaron mediante la realización de PCR *in silico* en la plataforma del NCBI. Se eligieron los pares de iniciadores P4f (5'-AAAGTCCACGCACTCCTCTG-3') y P4r (5'-AGAATGGCGACGGAAACCTT-3') generados con el software Primer3 Plus, cuya secuencia resultante abarcó desde la base 506 hasta la 1146 del tamaño total del gen, y los iniciadores P13f (5'-CCTGCACAAGTCAACAAGCC-3') y P13r (5'-GCGCAACTGTTGTCAACCAT-3') generados con el software Primers BLAST, que abarcaron desde la base 766 hasta la 1710.

Amplificación y secuenciación de los genes de β -tubulina y GPDH. La amplificación del gen β -tubulina se realizó con el juego de iniciadores Tub1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') y Tub22 (5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3') (Nosratabadi *et al.*, 2018), con las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización por 30 s a 94 °C, alineamiento de 45 s a 60 °C, extensión a 80 s a 72 °C; y extensión final a 72 °C por 7 min. Para la amplificación del gen GPDH se utilizaron los pares de iniciadores P13f - P13r y P4f - P4r diseñados en este estudio, bajo las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 2 min, alineamiento por 60 °C, extensión a 72 °C por 60 s; extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación fueron analizados

of denaturation at 94 °C for 2 min, alignment at 60 °C, extension at 72 °C for 60 s; final extension at 72 °C for 7 min. The amplification products were analyzed by horizontal agarose gel (1.8%) electrophoresis and ethidium bromide staining, which confirmed that the amplification products of the β -tubulin and GPDH genes corresponded to 950 bp and 450 bp, respectively. After electrophoresis, the amplification products were purified following the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit protocol and sent to the Institute of Biotechnology (UNAM) for sequencing.

Bioinformatic analysis. The sequences were edited using the MEGA X software and the consensus sequences of each gene were obtained from the sequences generated with the sense and antisense primers for each strain under study. Each resulting sequence was analyzed using the BLAST algorithm. In order to make the 3D designs of the β -tubulin protein molecule and identify the motifs, the sequences were aligned and compared using the BioEdit software. To search for conserved domains of the β -tubulin gene in strains susceptible and resistant to thiophanate methyl, the sequences were translated into proteins and aligned with the MEGA X software (Kumar *et al.*, 2018). The sequences of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* Fon12105 (accession KX369333) and Fon53 (accession KX369332), used in the study by Petkar *et al.* (2017), were used for this purpose. Mutations were manually identified in the alignment, and the sequences of three resistant strains of *F. oxysporum* and the susceptible strain Fon12105 were compared. The EzMol software was used for the identification of protein motifs, and the Phyre2 software was used for the 3D modeling of the molecules.

por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.8 % y tinción con bromuro de etidio, donde se corroboró que los productos de amplificación de los genes β -tubulina y GPDH correspondieran a 950 pb y 450 pb, respectivamente. Después de la electroforesis, los productos de amplificación se purificaron siguiendo el protocolo del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología (UNAM).

Análisis bioinformático. Se editaron las secuencias mediante el software MEGA X y se obtuvieron las secuencias consenso de cada gen a partir de las secuencias generadas con los iniciadores “sentido” y “antisentido”, para cada cepa en estudio. Cada secuencia resultante se analizó mediante el algoritmo BLAST. Con el fin de hacer los diseños en 3D de la molécula de la proteína β -tubulina e identificar los motivos, las secuencias se alinearon y compararon en el software BioEdit. Para la búsqueda de dominios conservados en el gen β -tubulina en cepas susceptibles y resistentes a tiofanato metílico, las secuencias se tradujeron a proteínas y se alinearon con el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), para tal propósito se incluyeron las secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* Fon12105 (acceso KX369333) y Fon53 (acceso KX369332) usadas en el estudio de Petkar *et al.* (2017). En el alineamiento se identificaron de forma manual las mutaciones y se compararon las secuencias de tres cepas de *F. oxysporum* resistentes *versus* la cepa susceptible Fon12105. Para la identificación de motivos proteicos se utilizó el software EzMol, en tanto que, para la modelación 3D de las moléculas se empleó el software Phyre2.

RESULTS

Fungicide resistance tests. The cluster analysis identified three groups, according to the response of *F. oxysporum* strains from vanilla to the fungicides under study: A) strains susceptible to benomyl and carbendazim, but resistant to thiophanate methyl and chlorothalonil; B) strains susceptible to benomyl, carbendazim and chlorothalonil, and resistant to thiophanate methyl; C) strains susceptible to the four fungicides under study (Figure 1). Group A comprised nine strains from Veracruz, Nayarit and Oaxaca; group B comprised two strains from Oaxaca; group C comprised one strain from Veracruz (Table 1). No relationship

RESULTADOS

Ensayos de resistencia a fungicidas. De acuerdo con la respuesta ante los fungicidas probados en cepas de *F. oxysporum* aisladas de vainilla, el análisis de conglomerados estableció tres grupos: A) cepas susceptibles a benomilo y carbendazim, pero resistentes a tiofanato metílico y clorotalonil; B) cepas susceptibles a benomilo, carbendazim y clorotalonil, y resistentes a tiofanato metílico; y C) cepas susceptibles a los cuatro fungicidas (Figura 1). En el grupo A se encontraron nueve cepas provenientes de Veracruz, Nayarit y Oaxaca; en el grupo B, dos cepas de Oaxaca; y en el grupo C, una cepa de Veracruz (Cuadro 1). No se encontraron diferencias

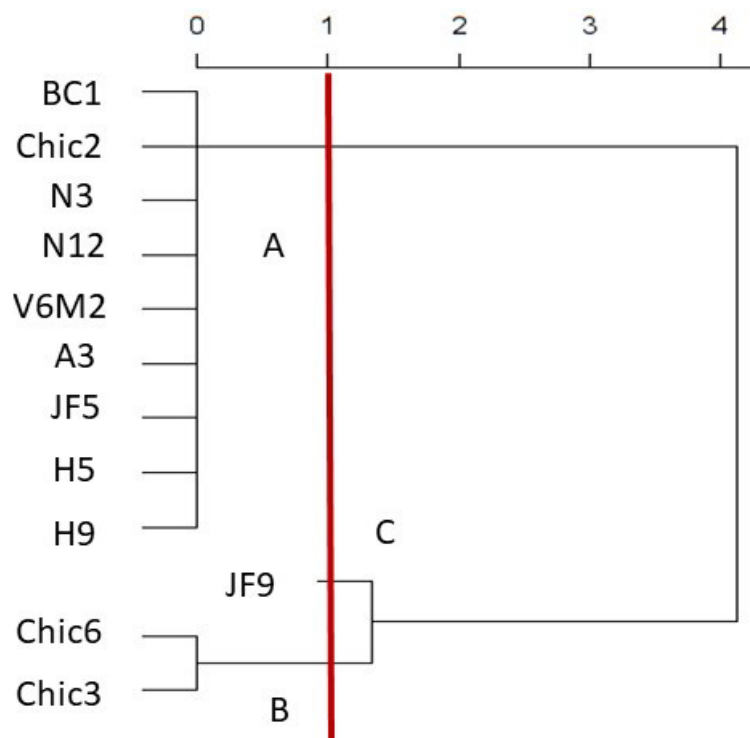


Figure 1. Grouping of *F. oxysporum* strains according to their susceptibility to benzimidazoles and chlorothalonil. A) susceptibility to benomyl and carbendazim, resistance to thiophanate methyl and chlorothalonil; B) susceptibility to benomyl, carbendazim and chlorothalonil, resistance to thiophanate methyl; C) susceptibility to all fungicides.

Figura 1. Agrupamiento de las cepas de *F. oxysporum* según su susceptibilidad a benzimidazoles y clorotalonil. A) susceptibilidad a benomilo y carbendazim, resistentes a tiofanato metílico y clorotalonil; B) susceptibilidad a benomilo, carbendazim y clorotalonil, resistentes a tiofanato metílico; C) susceptible a todos los fungicidas.

was found between the pathogenic character or the provenance of the strains and their susceptibility to fungicides ($P > 0.05$), according to the tests of the generalized linear model $\text{susceptibilidad} \sim \text{patogenicidad} + \text{provenance}$. It is important to note that no differences were observed in the response of the fungi due to the different concentrations of the fungicide used.

Amplification of β -tubulin and GPDH genes. In the 12 strains evaluated, the amplification produced a 950 bp fragment of the β -tubulin gene using the primers previously reported in the literature for this gene, and a 450 bp fragment of the GPDH gene using the P4F primers (Figure 3). No amplification product of the GPDH gene was obtained with the P13 primers.

Bioinformatic analysis. BLAST analysis confirmed that all the sequences obtained corresponded to the β -tubulin and GPDH genes, respectively (Table 2). The sequences of the pathogenic strains V6M2 and N3, and the non-pathogenic strains Chic6 and BC1, were used to find differences in the β -tubulin gene between the susceptible and resistant strains to the fungicides thiophanate methyl and chlorothalonil. The alignment analysis showed that the strain Fon12105 susceptible to thiophanate methyl (Petkar *et al.*, 2017) and the resistant strain Chic6 shared the thymine base at position 200, while adenine was found in the rest of the sequences (Figure 2). For the analysis of the GPDH gene, six sequences of strains resistant to chlorothalonil (N3, JF5, A3, V6M2, Chic2 and N12) and one susceptible strain (JF9) were considered. No mutations of the GPDH gene were found in these sequences, which suggests that the susceptibility or resistance response is not related to variations in the sequence of the analyzed region of this gene.

entre el carácter patogénico o la procedencia de las cepas en relación con la susceptibilidad a los fungicidas ($P > 0.05$), según las pruebas del modelo lineal generalizado $\text{susceptibilidad} \sim \text{patogenicidad} + \text{procedencia}$. Es importante destacar que no se observó diferencia en la respuesta de los hongos por las diferentes concentraciones utilizadas del fungicida.

Amplificación de los genes β -tubulina y GPDH. En las 12 cepas evaluadas, la amplificación produjo un fragmento de 950 pb para el gen β -tubulina utilizando los iniciadores previamente reportados en la literatura para este gen y de 450 pb para el gen GPDH usando los iniciadores P4F (Figura 3). No se obtuvo amplificación con los iniciadores P13 para el gen GPDH.

Análisis bioinformático. El análisis BLAST confirmó que todas las secuencias obtenidas correspondieron a los genes β -tubulina y GPDH, respectivamente (Cuadro 2). Con el fin de encontrar diferencias en el gen β -tubulina entre las cepas susceptibles y resistentes a los fungicidas tiofanato metílico y clorotalonil se emplearon las secuencias de las cepas patógenas V6M2 y N3 y las cepas no patógenas Chic6 y BC1. El análisis de alineamiento evidenció que la cepa susceptible al tiofanato metílico Fon12105 (Petkar *et al.*, 2017) y la cepa resistente Chic6, compartieron la base timina en la posición 200, mientras que en el resto de las secuencias se encontró adenina (Figura 2). Para el análisis del gen GPDH se consideraron seis secuencias de cepas resistentes a clorotalonil (N3, JF5, A3, V6M2, Chic2 y N12) y una cepa susceptible (JF9), en éstas no se encontraron mutaciones del gen GPDH, lo que lleva a proponer que la respuesta de susceptibilidad o resistencia no está relacionada con variaciones en la secuencia de la región analizada de este gen.

Table 2. Sequences of *Fusarium oxysporum* strains registered in the GenBank-NCBI database that had significant alignments by BLAST to the β -tubulin and GPDH gene sequences of *Fusarium oxysporum* strains isolated from *Vanilla planifolia*.

Cuadro 2. Secuencias de cepas de *Fusarium oxysporum* registradas en la base de datos del GenBank-NCBI, que produjeron alineamientos significativos mediante BLAST, a las secuencias de los genes β -tubulina y GPDH de cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de *Vanilla planifolia*.

Secuencias de <i>F. oxysporum</i> en GenBank-NCBI	Porcentaje de similitud	ID cepa de <i>F. oxysporum</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> strain ATCC 16612 beta-tubulin (BTU) gene, complete cds (Clave de acceso KT323825.1)	98.72	BC1
<i>F. oxysporum</i> isolate TX85 beta-tubulin (BTU) gene, complete cds (Clave de acceso MH827996.1)	97.85	V6M2
<i>F. oxysporum</i> isolate MS15 beta-tubulin (BTU) gene, complete cds (Clave de acceso MH827993.1)	96.91	N3
<i>F. solani</i> strain MICMW-30.1 beta-tubulin gene, partial cds (Clave de acceso KX912242.1)	94.34	Chic6
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase Mrna (Clave de acceso XM_018394006.1)	97.84	N3
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	95.60	JF5
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	95.32	JF9
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	99.29	A3
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	99.64	V6M2
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	100	Chic2
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	99.82	N12

Identification of motifs. It was found that the sequences of the β -tubulin protein in the strains N3, BC1 and Fon53, which were resistant to thiophanate methyl, and the susceptible strain Fon 12105, share motifs 237537 and 335235. Strain N3 differs, as it has motifs 236152 and 279881, while the Fon 12105 strain was the only one to have the 237844 motif (Figure 3).

3D structures of target proteins. The three-dimensional structure of the β -tubulin protein showed differences between the susceptible strain and the strains resistant to thiophanate methyl. It

Identificación de motivos. Se encontró que las secuencias de la proteína β -tubulina de las cepas N3, BC1 y Fon53 resistentes a tiofanato metílico y la cepa susceptible Fon 12105, comparten los motivos 237537 y 335235. La cepa N3 se diferencia por presentar los motivos 236152 y 279881, en tanto que la cepa Fon 12105 fue la única en presentar el motivo 237844 (Figura 3).

Estructuras 3D de las proteínas blanco. La estructura tridimensional de la proteína β -tubulina mostró diferencias entre la cepa susceptible y las resistentes al tiofanato metílico, específicamente se

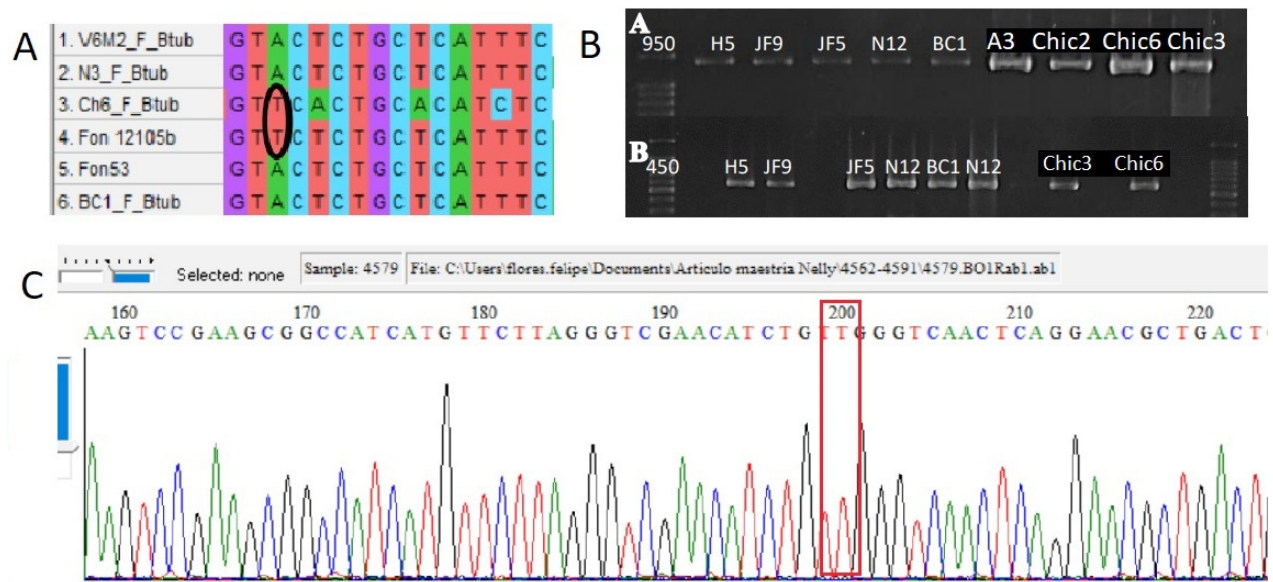


Figure 2. A) Fragment of the alignment of the β -tubulin gene sequences where it can be observed that the strains Ch6 (Chic6, present study) and Fon12105b (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*, Petkar *et al.*, 2017) share the thymine nucleotide at position 200 (framed in the rectangle). Chic6 is resistant to thiophanate methyl, while Fon12105b is susceptible. B) Amplification of PCR products in agarose gel of the β -tubulin gene (A) and GPDH gene (B) of some *Fusarium* strains under study. C) Electropherogram of the β -tubulin gene sequence of the Chic6 strain, resistant to thiophanate methyl, showing thymine at position 200.

Figura 2. A) Fragmento del alineamiento de las secuencias del gen β -tubulina donde se observa en la posición 200 (enmarcada en el rectángulo) que las cepas Ch6 (Chic6, este estudio) y Fon12105b (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*, Petkar *et al.*, 2017) comparten el nucleótido timina, siendo Chic6 resistente al tiofanato metílico, mientras que Fon12105b es susceptible. B) Amplificación de productos de PCR en gel de agarosa del gen β -tubulina (A) y gen GPDH (B) de algunas cepas de *Fusarium* en estudio. C) Electroferograma de la secuencia del gen β -tubulina de la cepa Chic6, resistente al tiofanato metílico, donde se muestra la timina en la posición 200.

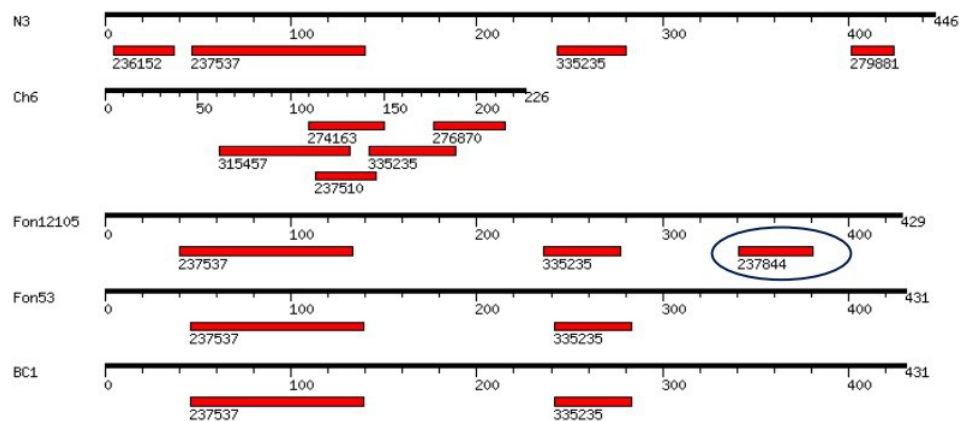


Figure 3. Search for conserved domains in the β -tubulin gene of strains of *F. oxysporum* that are susceptible and resistant to thiophanate methyl, isolated from *V. planifolia*. The 237844 motif in the susceptible strain Fon12105 (Petkar *et al.*, 2017) was found not to be present in the resistant strains Fon53 (Petkar *et al.*, 2017), N3 and BC1.

Figura 3. Búsqueda de dominios conservados en el gen β -tubulina en cepas de *F. oxysporum*, susceptibles y resistentes a tiofanato metílico, aisladas de *V. planifolia*. Se encontró que el motivo 237844 en la cepa Fon12105 susceptible (Petkar *et al.*, 2017) no está presente en las cepas resistentes Fon53 (Petkar *et al.*, 2017), N3 y BC1.

was found that the resistant strains V6M2, BC1 and Fon53 have the amino acid arrangement histidine-glycine-serine, while strain Fon12105 has, at the same position, cysteine-cysteine-proline (Figure 4a). The GPDH proteins of the JF5 (resistant to chlorothalonil) and JF9 (susceptible to chlorothalonil) strains showed a different structure than the proteins of the resistant strains A3, V6M2, Chic2 and N12 (Figure 4b).

encontró que las cepas resistentes V6M2, BC1 y Fon53 tienen el arreglo de aminoácidos histidina-glicina-serina, en tanto que, en la misma posición, la cepa Fon12105 tiene cisteína-cisteína-prolina (Figura 4a). Las proteínas GPDH de las cepas JF5 (resistente a clorotalonil) y JF9 (susceptible a clorotalonil) mostraron una estructura diferente a las proteínas de las cepas resistentes A3, V6M2, Chic2 y N12 (Figura 4b).

DISCUSSION

The limited genetic variability of vanilla (*V. planifolia*) makes it highly vulnerable to various pathogens (Koyyappurath *et al.*, 2015). The fungus *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, causal agent of root and stem rot disease, poses an important phytosanitary

DISCUSIÓN

La limitada variabilidad genética que tiene la vainilla (*V. planifolia*) la hace altamente vulnerable ante diversos patógenos (Koyyappurath *et al.*, 2015). El hongo *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, agente causal de la enfermedad de pudrición de raíz y

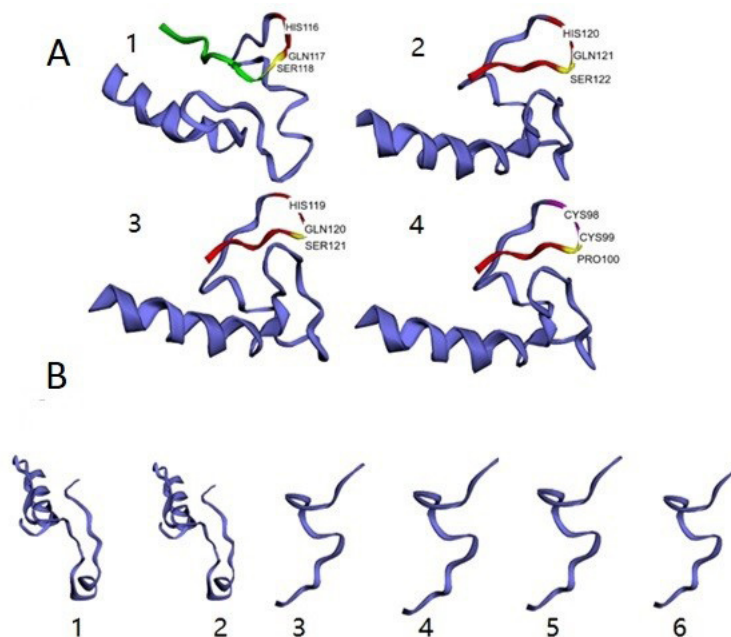


Figure 4. 3D models of the target proteins of: A) thiophanate methyl (1, strain V6M2; 2, strain Fon 53; 3, strain BC1; 4, strain Fon12105); B) chlorothalonil (1, strain JF5; 2, strain JF9; 3, strain A3; 4, strain V6M2; 5, strain Chic2; 6, strain N12). Structural differences are observed in both cases associated with resistance to fungicides.

Figura 4. Modelos 3D de las proteínas blanco de: A) tiofanato metílico (1, cepa V6M2; 2, cepa Fon 53; 3, cepa BC1; 4, cepa Fon12105); B) clorotalonil (1, cepa JF5; 2, cepa JF9; 3, cepa A3; 4, cepa V6M2; 5, cepa Chic2; 6, cepa N12). Se observan diferencias estructurales en ambos casos asociadas a la resistencia a los fungicidas.

problem for vanilla producers worldwide (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2016b; Casillas-Isiordia *et al.*, 2017).

Different types of control have been researched to combat this disease: genetic, cultural, biological and chemical. The latter is the most widely used by producers since it is cheap, effective and easily accessible. However, the excessive use of fungicides can lead to development of resistance to their active principles in fungi, as has happened with pathogens of other crops (Hobbelen *et al.*, 2011; Steinberg and Gurr, 2020). Some species of the genus *Fusarium*, such as *F. fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), *F. graminearum* (Duan *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018), *F. asiaticum* (Suga *et al.*, 2011), among others, have been reported as resistant to some fungicides such as benomyl, thiophanate methyl and carbendazim. In the case of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, there are no previous reports of its resistance or susceptibility to fungicides.

In vanilla cultivation, the most used fungicides are from the benzimidazole group (Hernández-Hernández, 2019), such as benomyl, carbendazim and thiophanate methyl, which have systemic activity. Broad-spectrum multi-site contact fungicides such as chlorothalonil are widely recommended. When in contact with the fungus, benzimidazoles inhibit the assembly of microtubules through the degradation of β -tubulin, preventing the generation of the mitotic spindle, thus interrupting cell division (Chung *et al.*, 2009). Chlorothalonil inhibits the activity of the enzyme glycerol-3-phosphate-dehydrogenase (GPDH) that is part of the glycolysis pathway of the fungus (Long and Siegel, 1975).

Benzimidazoles are widely used in agricultural production, although the 2019 FRAC list describes resistance to benzimidazoles as a common feature among fungal species, including some special forms

tallos, representa un importante problema fitosanitario para los productores de vainilla a nivel mundial (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2016b; Casillas-Isiordia *et al.*, 2017).

Para combatir esta enfermedad se tienen avances en la investigación o la aplicación de varios tipos de control: genético, cultural, biológico y químico. Este último es el más utilizado por los productores, ya que su costo es bajo, efectivo y de fácil acceso; no obstante, el uso excesivo de los fungicidas puede provocar que los hongos generen resistencia a los principios activos de estos, como ha sucedido en patógenos de otros cultivos (Hobbelen *et al.*, 2011; Steinberg y Gurr, 2020). Algunas especies del género *Fusarium*, como *F. fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), *F. graminearum* (Duan *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018), *F. asiaticum* (Suga *et al.*, 2011), entre otras, han sido reportadas como resistentes a algunos fungicidas como el benomilo, el tiofanato metílico y el carbendazim. En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* no existen reportes previos acerca de su resistencia o susceptibilidad a fungicidas.

En el cultivo de la vainilla, los fungicidas más utilizados son de la familia de los bencimidazoles (Hernández-Hernández, 2019), como el benomilo, carbendazim y el tiofanato metílico, que tienen actividad sistémica; así mismo, fungicidas de contacto multisitio de amplio espectro, como el clorotalonil, son ampliamente recomendados. Los bencimidazoles en contacto con el hongo inhiben el ensamblaje de los microtúbulos mediante la degradación de la β -tubulina, impidiendo la generación del huso mitótico, interrumpiéndose así la división celular (Chung *et al.*, 2009). En tanto que, el clorotalonil inhibe la función de la enzima glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPDH) que forma parte de la ruta de la glucólisis del hongo (Long y Siegel, 1975).

El uso de los bencimidazoles está ampliamente extendido en la producción agrícola, aunque, en

of *F. oxysporum*, including *lilii*, *gladioli* (Chung *et al.*, 2009), *lycopersici* (Amini and Sidovich, 2010) and *niveum* (Petkar *et al.*, 2017). In the present study, all strains of *F. oxysporum* (pathogenic and non-pathogenic to vanilla) were susceptible to benomyl and carbendazim, while nine strains were resistant to thiophanate methyl regardless of their pathogenic character.

Petkar *et al.* (2017) proposed that the substitution of thymine (T) for adenine (A) in position 200 of the β -tubulin gene encodes two different amino acids, phenylalanine (TTC) and tyrosine (TAC), which are probably what determines the quality of susceptibility or resistance to thiophanate methyl, respectively. The comparison of the sequences of the pathogenic and non-pathogenic *F. oxysporum* strains of vanilla that are resistant to thiophanate methyl against the sequence of the susceptible (Fon12105) and resistant (Fon53) strains of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* used in the study by Petkar *et al.* (2017) showed that the strains Fon12105 (susceptible strain) and Chic6 (resistant strain of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*) have a thymine (T) at position 200, while the rest of the resistant strains have an adenine (A) at the same position. The hypothesis that resistance to this fungicide is explained by a substitution in this specific position of the coding sequence of this gene is ruled out. It has previously been proposed that in *Fusarium fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), as well as in other *formae speciales* of *F. oxysporum* (Chung *et al.*, 2009; Amini and Sidovich, 2010), phenylalanine is found at position 200 of the gene, independently of the resistance or susceptibility to thiophanate methyl. Other studies attribute the resistance to benzimidazoles of *Sclerotinia homoeocarpa* to the mutation from phenylalanine to tyrosine (Dowling *et al.*, 2017), and indicate that the reverse mutation tyrosine-phenylalanine is responsible for resistance in *Colletotrichum musae* (dos Santos-Vieira *et al.*, 2017).

la lista 2019 del FRAC se describe la resistencia a los bencimidazoles como una característica común entre las especies fúngicas, entre ellas algunas formas especiales de *F. oxysporum*, por ejemplo, *lilii*, *gladioli* (Chung *et al.*, 2009), *lycopersici* (Amini y Sidovich, 2010) y *niveum* (Petkar *et al.*, 2017). En este estudio, todas las cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de vainilla, presentaron susceptibilidad a benomilo y a carbendazim, en tanto que, nueve cepas fueron resistentes a tiofanato metílico, sin distinción de su carácter patogénico.

Petkar *et al.* (2017) plantearon que el cambio de timina (T) por adenina (A) en la posición 200 del gen β -tubulina codifica dos aminoácidos distintos, fenilalanina (TTC) y tirosina (TAC), lo que daría la cualidad de susceptibilidad o resistencia al tiofanato metílico, respectivamente. Partiendo del hecho de que la comparación de las secuencias de las cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de vainilla, resistentes al tiofanato metílico, contra la secuencia de la cepa susceptible (Fon12105) y la resistente (Fon53) de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* empleadas en el estudio de Petkar *et al.* (2017) mostró que las cepas Fon12105 (cepa susceptible) y Chic6 (cepa resistente de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*) tienen en la posición 200 una timina (T), y que el resto de las cepas resistentes poseen una adenina (A), se descarta la hipótesis de que la resistencia a este fungicida está explicada por un cambio en esta posición específica de la secuencia codificante de este gen. Con anterioridad se ha propuesto que en *Fusarium fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), así como en otras *formae speciales* de *F. oxysporum* (Chung *et al.*, 2009; Amini y Sidovich, 2010), se encuentra la fenilalanina en la posición 200 del gen, independiente a la resistencia o susceptibilidad hacia el tiofanato metílico. Otros estudios confieren la resistencia a los bencimidazoles en *Sclerotinia homoeocarpa* a la mutación de fenilalanina a tirosina (Dowling *et al.*, 2017), así como, que la mutación inversa (tirosina-fenilalanina) es la responsable de

Due to the controversy regarding the mutation in codon 200 as the one responsible for the resistance or susceptibility of the fungus to the fungicide, the present study searched for conserved motifs in the gene sequences. It was found that the motif 237844 (Pfam) was only present in the susceptible strain, which suggests that in strains that are resistance to thiophanate methyl, the site of binding and action of the fungicide does not include the codon residue, as proposed by Vela-Corcía *et al.* (2018) in a study of the coupling between the action site of benzimidazoles and the protein β -tubulin. No further biological information was found for motif 237844 (Pfam).

Benzimidazoles interfere with certain sites associated with the polymerization of α 1-tubulin, α 2-tubulin and β 2-tubulin monomers. However, once microtubule polymerization is complete, it is can no longer be reversed (Zhou *et al.*, 2016). Polymerization inhibition depends on the active ingredient; thus, benomyl and carbendazim act on the α 1/ β 2 and α 2/ β 2 subunits, while thiabendazole shows a lower capacity to inhibit α 2/ β 2 (Zhou *et al.*, 2016), which could be related to a greater probability of resistance. Regarding thiophanate methyl, there are no data on how it affects these polymerization processes, and it may behave in a similar way to thiabendazole. Further studies are needed on the mode of action of thiophanate methyl to determine if this is the resistance mechanism of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Chlorothalonil inhibits the fungal enzymatic activity of dehydrogenases, catalases, and acid phosphatases (Baćmaga *et al.*, 2018); it specifically inhibits the activity of the GPDH enzyme (Long and Siegel, 1975). The high levels of resistance to chlorothalonil found in pathogenic and non-pathogenic strains of *F. oxysporum* associated with the root of *V. planifolia* contradict the annotations of FRAC (2019), which considers chlorothalonil as

la resistencia en *Colletotrichum musae* (dos Santos-Vieira *et al.*, 2017).

Debido a la contraposición encontrada, respecto a la mutación en el codón 200 como la responsable de la resistencia o susceptibilidad del hongo al fungicida, el estudio se condujo hacia la búsqueda de motivos conservados en las secuencias del gen, encontrándose que el motivo 237844 (Pfam) únicamente se presentó en la cepa susceptible, lo que sugiere que en la resistencia al tiofanato metílico, el sitio de unión y acción del fungicida podría no incluir al residuo del codón, como lo propuso Vela-Corsía *et al.* (2018) al estudiar el acoplamiento entre el sitio de acción de los bencimidazoles con la proteína β -tubulina. No se encontró mayor información biológica para el motivo 237844 (Pfam).

Los bencimidazoles interfieren en ciertos sitios de la polimerización de los monómeros de α 1-tubulina, α 2-tubulina y β 2-tubulina, sin embargo, una vez realizada la polimerización de los microtúbulos, ésta ya no se revierte (Zhou *et al.*, 2016). La inhibición de la polimerización depende del principio activo, así, el benomilo y carbendazim actúa en las subunidades α 1/ β 2 y α 2/ β 2, mientras que en el caso del tiabendazol se ha observado una menor capacidad de inhibir α 2/ β 2 (Zhou *et al.*, 2016), lo que estaría relacionado con una mayor probabilidad de resistencia. Para el tiofanato metílico no se tienen datos sobre cómo afecta estos procesos de polimerización, siendo posible que se comporte de manera similar al tiabendazol. Son necesarios más estudios acerca del modo de acción del tiofanato metílico para determinar si es éste el mecanismo de resistencia en *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

El clorotalonil inhibe la actividad enzimática fúngica de deshidrogenasas, catalasas y fosfatasa ácidas (Baćmaga *et al.*, 2018); de manera específica, inhibe la actividad de la enzima GPDH (Long y Siegel, 1975). Los altos niveles de resistencia al clorotalonil encontrados en cepas patógenas y no

part of a group of fungicides with a low level of risk in the generation of resistance due to its multisite action. However, this fungicide has shown high effectiveness against other *formae speciales* of *F. oxysporum* such as *F. oxysporum* f. sp. *lentis* (Dahal and Shrestha, 2018).

Although the strains of *F. oxysporum* associated with vanilla did not present variations in the GPDH gene that explain the difference in the response to chlorothalonil, some characteristics of the conserved motifs of the enzyme could be associated with susceptibility. To determine the resistance mechanism, it is necessary to study other target enzyme systems for this and other fungicides, since *Fusarium* strains associated with vanilla have shown a high variation in enzymatic activity (Adame-García *et al.*, 2011) as well as high genetic variability (Flores-de la Rosa *et al.*, 2018), which explains the variability in their response to the fungicides under study. Regarding other multisite fungicides, such as mancozeb, a substantial reduction in susceptibility has been recorded in many pathogen species. This has been associated with genes involved in the formation of transcriptional machinery, regulation of cellular pH, and transporters of multiple drugs (Yang *et al.* 2019).

CONCLUSIONS

Pathogenic and non-pathogenic *F. oxysporum* strains of *V. planifolia* were highly susceptible to the fungicides benomyl and carbendazim, and highly resistant to thiophanate methyl and chlorothalonil. The point mutation from adenine to thymine in codon 200 of the β -tubulin gene, encoding phenylalanine/tyrosine, respectively, is not responsible for resistance to thiophanate methyl, as has been proposed by other authors.

patógenas de *F. oxysporum* asociadas a la raíz de *V. planifolia* contradice a las anotaciones del FRAC (2019), que considera al clorotalonil como parte de un grupo con bajo nivel de riesgo en la generación de resistencia por su naturaleza multisitio de acción. No obstante, este fungicida ha mostrado alta efectividad contra otras *formae speciales* de *F. oxysporum* como *F. oxysporum* f. sp. *lentis* (Dahal y Shrestha, 2018).

Si bien, las cepas de *F. oxysporum* asociado a vainilla no presentaron variaciones en el gen GPDH que expliquen la diferencia en la respuesta al clorotalonil, hay indicios dentro de los motivos conservados de la enzima que podrían estar asociados a la susceptibilidad. Para determinar el mecanismo de resistencia es necesario enfocar investigaciones que involucren de manera integral otros sistemas enzimáticos blanco reportados para este y otros fungicidas, toda vez que las cepas de *Fusarium* asociadas a vainilla han revelado alta variación en la actividad enzimática (Adame-García *et al.*, 2011) y alta variabilidad genética (Flores-de la Rosa *et al.*, 2018), que explica su respuesta variable ante los fungicidas probados. Para otros fungicidas multisitio, como el mancozeb, se ha documentado una reducción sustancial de la sensibilidad en muchas especies de patógenos, la cual ha sido asociada con los genes que involucran la formación de la maquinaria transcripcional, la regulación del pH celular y los transportadores de múltiples fármacos (Yang *et al.* 2019).

CONCLUSIONES

Las cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de *V. planifolia*, fueron altamente susceptibles a los fungicidas benomilo y carbendazim, y altamente resistentes a tiofanato metílico y clorotalonil. La mutación puntual de adenina a timina en

The presence of conserved motifs may be related to the susceptibility of the fungus to this fungicide. No evidence was found that the variability in the analyzed sequence of the GPDH gene is related to the response of susceptibility or resistance to chlorothalonil.

ACKNOWLEDGMENTS

N. A. González-Oviedo wishes to thank CONACYT for the scholarship for master studies number 629405.

CITED LITERATURE

- Adame-García J, Trigos-Landa A, Iglesias-Andreu LG, Flores-Estevez N and Luna-Rodríguez M. 2011. Isozymic and pathogenic variations of *Fusarium* spp. associated with vanilla stem and root rotting. Tropical and Subtropical Agroecosystems 13:299-306. <https://www.revista.criba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1330/663>
- Adame-García J, Rodríguez-Guerra R, Iglesias-Andreu LG, Ramos-Prado JM and Luna-Rodríguez M. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. Botanical Sciences 93:669–678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Adame-García J, Flores-de la Rosa FR, Ricaño-Rodríguez J and Luna-Rodríguez M. 2016a. Adequacy of a protocol for amplification of EF-1 α gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science 11:236–241. http://www.arpnjournals.org/jabs/research_papers/rp_2016/jabs_0616_804.pdf
- Adame-García J, Luna-Rodríguez M and Iglesias-Andreu LG. 2016b. Vanilla rhizobacteria as antagonists against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. International Journal of Agriculture and Biology 18:23–30. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0053>
- Amini J and Sidovich D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. Journal of Plant Protection Research 50:172–178. <http://www.plantprotection.pl/pdf-91523-25801?filename=The%20effects%20of%20fungicides.pdf>
- Arie T. 2019. *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular genetic studies. Journal of Pesticide Sciences 44(4): 275 – 281. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>
- Baćmaga M, Wyszowska J and Kucharski J. 2018. The influence of chlorothalonil on the activity of soil microorganisms and enzymes. Ecotoxicology 27. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1968-7>
- Casillas-Isiordia R, Flores-de la Rosa FR, Can-Chulim Á, Luna Esquivel G, Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Guerrero LG, Luna-Rodríguez M and Aguirre Beltrán G. 2017.

el codón 200 del gen β -tubulina, que codifican fenilalanina/tirosina, respectivamente, no es la responsable de la resistencia al tiofanato metílico, como ha sido propuesto por otros autores, no obstante, se encontraron indicios de que la presencia de motivos conservados pueda estar relacionada con la susceptibilidad del hongo a este fungicida. No se encontró evidencia de que la variabilidad en la secuencia analizada del gen GPDH esté relacionada con la respuesta de susceptibilidad o resistencia al clorotalonil.

AGRADECIMIENTOS

N. A. González-Oviedo agradece al CONACYT por la beca número 629405 para estudios de maestría.

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

- Fusarium* sp. associated with *Vanilla* sp. rot in Nayarit, Mexico. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 12:43–50. [http://www.arpnjournals.org/jabs/research\\_papers/rp\\_2017/jabs\\_0217\\_844.pdf](http://www.arpnjournals.org/jabs/research_papers/rp_2017/jabs_0217_844.pdf)
- Chen Z, Gao T, Liang S, Liu K, Zhou M and Chen C. 2014. Molecular mechanism of resistance of *Fusarium fujikuroi* to benzimidazole fungicides. FEMS Microbiology Letters 357:77–84. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12504>
- Chung WH, Chung WC, Ting PF, Ru CC, Huang HC and Huang JW. 2009. Nature of resistance to methyl benzimidazole carbamate fungicides in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* and *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* in Taiwan. Journal of Phytopathology 157:742–747. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01545.x>
- Dahal N and Shrestha R. 2018. Evaluation of efficacy of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis in vitro* at Lamjung, Nepal. Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science 35:105–112. <https://doi.org/10.3126/jiaas.v35i1.22520>
- dos Santos Vieira WA, Guerreiro Lima W, Souza Nascimento E, Michereff S, Doyle VA and Saraiva Camara M. 2017. Thiophanate-methyl resistance and fitness components of *Colletotrichum musae* isolates from banana in Brazil. Plant Disease 101:1659–1665. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1594-RE>
- Dowling ME, Hu MJ and Schnabel G. 2017. Fungicide resistance in *Botrytis fragariae* and species prevalence in the Mid-Atlantic United States. Plant Disease 102:964–969. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1615-RE>

- Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J and Zhou M. 2014. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. Scientific Reports 4:7094 <https://doi.org/10.1038/srep07094>
- Flores-de la Rosa FR, De Luna E, Adame-García J, Iglesias-Andreu LG and Luna-Rodríguez M. 2018. Phylogenetic position and nucleotide diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* worldwide based on translation elongation factor 1a sequences. Plant Pathology 67:1278–1285. <https://doi.org/10.1111/ppa.12847>
- Hernández-Hernández J. 2019. Mexican vanilla production. Pp: 3–38. In: Havkin-Frenkel D and Belanger FC (eds.). Handbook of Vanilla Science and Technology. Second edition. Hoboken, Wiley Blackwell, New Jersey, USA. 500p <https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Vanilla+Science+and+Technology%2C+2nd+Edition-p-9781119377276>
- Hobbelen P, Paveley N and Bosch F. 2011. Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: a modeling analysis. Phytopathology 101:1224–1233. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-10-0290>
- Koyyappurath S, Conejero G, Dijoux JB, Lapeyre-Montes F, Jade K, Chiroleu F, Gatineau F, Verdeil JL, Besse P and Grisoni M. 2015. Differential responses of vanilla accessions to root rot and colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*. Frontiers in Plant Science 6: 1125. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01125>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution 35(6): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lecomte C, Edel-Hermann V, Cannesan MA, Gautheron N, Langlois A, Alabouvette C, Robert F and Steinberg C. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*: underestimated genetic diversity. European Journal of Plant Pathology 145(2): 421–431. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0856-3>
- Long JW and Siegel MR. 1975. Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2,4,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems. Chemico-biological Interactions 10(6): 383–394. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(75\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(75)90069-1)
- Lubinsky P, Bory S, Hernández-Hernández J, Kim SC and Gómez-Pompa A. 2008. Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). Economic Botany 62(2): 127–138. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>
- Nosratabadi M, Kachuei R, Rezaie S and Harchegani AB. 2018. Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species by PCR-RFLP analysis. Le Infezioni in Medicina, 26(1): 52–60. [https://www.infezmed.it/media/journal/Vol\\_26\\_1\\_2018\\_7.pdf](https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_26_1_2018_7.pdf)
- Petkar A, Langston DB, Buck JW, Stevenson KL and Ji P. 2017. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-methyl. Plant Disease 101:366–371. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1236-RE>
- Pinaria A, Liew ECY and Burgess L. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. Australasian Plant Pathology 39:176–183. <https://doi.org/10.1071/AP09079>
- Steinberg G and Gurr SJ. 2020. Fungi, fungicide discovery and global food security. Fungal Genetics and Biology 144: 103476. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103476>
- Suga H, Nakajima T, Kageyama K and Hyakumachi M. 2011. The genetic profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant strains of *Fusarium asiaticum* in Japan. Fungal Biology 115:1244–1250. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.08.009>
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R and Leunissen JA. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acid Research 35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Vela-Corcía D, Romero D, de Vicente A and Pérez-García A. 2018. Analysis of  $\beta$ -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. Scientific Reports 8:7161. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25336-5>
- Yang LN, He MH, Ouyang HB, Zhu W, Pan ZC, Sui QJ, Shang LP and Zhan J. 2019. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. BMC Microbiology 19:205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>
- Zhang X, Chen X, Jiang J, Yu M, Yin Y and Ma Z. 2015. The tubulin cofactor A is involved in hyphal growth, conidiation and cold sensitivity in *Fusarium asiaticum*. BMC Microbiology 15:35. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0374-z>
- Zhou Y, Xu J, Zhu Y, Duan Y and Zhou M. 2016. Mechanism of action of the benzimidazole fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule. Phytopathology 106(8):807–813. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0186-R>
- Zhu Y, Liang X, Li Y, Duan Y, Zheng Z, Wang J and Zhou M. 2018. F240 of  $\beta$  2- Tubulin explains why *Fusarium graminearum* is less sensitive to carbendazim than *Botrytis cinerea*. Phytopathology 108:352–361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0295-R>

# Polyphenols extraction from creosote bush, tarbush, and soursop using ultrasound-microwave and their effect against *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*

## Extracción de polifenoles de gobernadora, hojaseén, y guanábana utilizando ultrasonido-microondas y su efecto contra *Alternaria alternata* y *Fusarium solani*

**Francisco Castillo-Reyes**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Saltillo. Carretera Saltillo-Zacatecas km 8.5, No. 9515, Col. Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315; **Erik De León-Juárez**, **Sendar D. Nery-Flores**, **Adriana Carolina Flores-Gallegos**, **Lizeth G. Campos-Muzquiz**, **Juan A. Ascacio-Valdés**, **Raúl Rodríguez-Herrera\***, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Saltillo. Blvd. Carranza y Ing. José Cárdenas V. s/n. Col. República Oriente. CP. 25280, Saltillo.

\* Corresponding author: raul.rodriguez@uadec.edu.mx

Received: June 27, 2022.

Accepted: August 19, 2022.

Castillo-Reyes F, De León-Juárez E, Nery-Flores SD, Flores-Gallegos AC, Campos-Muzquiz LG, Ascacio-Valdés JA and Rodríguez-Herrera R. 2022. Polyphenols extraction from creosote bush, tarbush, and soursop using ultrasound-microwave and their effect against *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 349-376.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-7>

First DOI publication: August 30, 2022.

Primera publicación DOI: 30 de Agosto, 2022.

**Abstract.** Crops are affected by different pathogens that cause damage to the plant and production losses. Quarantine restrictions may also occur due to the presence of a pathogen. In

**Resumen.** Los cultivos agrícolas se ven afectados por diferentes patógenos que ocasionan daños a la planta, pérdidas en la producción, además se pueden presentar restricciones cuarentenarias por la presencia de algún patógeno. Para el control de fitopatógenos en el mayor de los casos, se emplean productos químicos sintéticos, sin embargo, algunos de estos productos se han asociado a riegos a la salud humana o al ambiente. Por lo que es necesario la búsqueda de alternativas más sustentables de control de estos patógenos. Esta investigación se realizó bajo los siguientes objetivos: extraer polifenoles de hojas de gobernadora, hojaseén y guanábana, utilizando: diferentes relaciones masa/volumen (m/v), diferentes concentraciones de etanol, simultáneamente ultrasonido-microondas y determinar el efecto de estos polifenoles contra *Alternaria*

most cases, synthetic chemical products are used to control phytopathogens. However, some of these products have been associated with risks to human health or the environment. Therefore, it is necessary to search for more sustainable alternatives to control these pathogens. This research was carried out under the following objectives: 1. To extract polyphenols from Creosote bush, Tarbush and Soursop leaves using: different mass/volume ratios (m/v), different concentrations of ethanol, simultaneous ultrasound-microwave and 2. To determine the effect of these polyphenols against *Fusarium solani* and *Alternaria alternata*. Polyphenols were obtained from Creosote bush, Tarbush and Soursop leaves by combining ultrasound-microwave, and using different mass-volume ratios and ethanol percentages. The group of polyphenols (CD) obtained with a mass/volume (m/v) ratio of 1:8 and 70% ethanol from Creosote bush leaves and the group of polyphenols (CA) obtained with a m/v ratio 1:16 and 70% ethanol from Tarbush leaves were the most effective against *Fusarium solani*, inhibiting 90.4 and 60.67%, respectively. For *Alternaria alternata*, no differences were found in the mycelial inhibition by the different groups of evaluated polyphenols, with inhibition values between 50-60% in comparison to the negative control (without polyphenols). In the profile of CD polyphenols group obtained from Creosote bush, different polyphenolic compounds reported to have antimicrobial activity were found, among which the following stand out: epirosmanol, rosmadiol, apigenin, catechin, and procyanidin C1. Polyphenolic compounds isolated from Creosote bush, Tarbush, and Soursop leaves using environmentally friendly methods (ultrasound-microwave) and solvents (water and ethanol) showed antifungal activity against *F. solani* and *A. alternata*.

*alternata* y *Fusarium solani*. Se obtuvieron polifenoles de hojas de gobernadora, hojasén y guanábana mediante combinación de ultrasonido-microondas, y usando diferentes relaciones masa-volumen y porcentajes de etanol. Además, se observó que el grupo de polifenoles obtenido con la relación masa/volumen (m/v) 1:8 y etanol al 70% (CD) a partir de hojas de Gobernadora y el grupo de polifenoles obtenido con la relación m/v 1:16 y etanol al 70% (CA) a partir de hojas de hojasén fueron las más efectivos contra *Fusarium solani* inhibiendo 90.4 y 60.67%, respectivamente. En *Alternaria alternata* no se encontraron diferencias en el efecto de la inhibición por los diferentes grupos de polifenoles evaluados, y se mostraron valores de inhibición entre 50-60% en comparación con el testigo negativo (sin polifenoles). En el perfil de grupo de polifenoles CD obtenido de gobernadora se encontraron diversos compuestos polifenolicos reportados por tener actividad antimicrobiana entre los que destacan: epirosmanol, rosmadiol apigenina, catequina, procianidina C1. Los compuestos polifenolicos aislados de gobernadora, hojasén y guanábana utilizando métodos (ultrasonido-microondas) y disolventes (agua y etanol) amigables con el ambiente presentan actividad antifúngica contra *F. solani* y *A. alternata*.

**Palabras clave:** Inhibición micelial, microondas-ultrasonido, etanol, agua, amigables con él ambiente.

*Alternaria alternata* y *Fusarium solani* son hongos fitopatógenos que causan grandes pérdidas económicas en la agricultura y reducen la disponibilidad de alimentos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2019; Martínez-de la Parte *et al.*, 2021). *Alternaria alternata* se caracteriza por una infección acelerada (Mata-Santoyo *et al.*, 2018). Cuando la temperatura

**Keywords:** Mycelial inhibition, Ultrasound-Microwave, Ethanol, Water, Environment friendly.

*Alternaria alternata* and *Fusarium solani* are phytopathogenic fungi that cause great economic losses to agricultural producers and reduce food availability (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2019; Martínez-de la Parte *et al.*, 2021). *Alternaria alternata* is characterized by causing an accelerated infection (Mata-Santoyo *et al.*, 2018). With a temperature between 28 and 30 °C and relative humidity greater than 80%, the infection can begin or worsen in approximately 4 hours (Castrillo *et al.*, 2021). The spores of *A. alternata* are dispersed mainly by wind or rain splash, and these spores can overwinter among crop residues until conditions are favorable for germination (Abbas *et al.*, 2021). *Fusarium solani* mainly attacks plants in the base of the stem and root areas (Martínez-Martínez *et al.*, 2020), causing wilting, yellowing of the leaves and growth delay (Martínez-Solórzano *et al.*, 2020). Under conditions of high humidity and temperatures over 20 °C in the soil, a severe attack of *F. solani* can make the plants brittle. This pathogen survives in the soil among crop debris and live plants, and agricultural machinery can play an important role in its spread (Reyes-Tena *et al.*, 2019). These phytopathogenic fungi are controlled mainly through the use of synthetic chemical fungicides, which, although effective, can lead fungi to generate resistance to their active compounds, which would pose new risks to human health and the environment (Abdel-Monaim *et al.*, 2011; Mantecón, 2015). This has driven the search for more environmentally friendly alternatives such as antifungal compounds of plant origin.

Plants synthesize phytochemicals, such as phytoanticipins and phytoalexins, that play an important role on plant growth and reproduction,

esta entre 28-30 °C y la humedad relativa mayor a 80%, esta infección puede comenzar o agravarse en un tiempo aproximado de 4 h (Castrillo *et al.*, 2021). La diseminación de las esporas de *A. alternata* ocurre principalmente por el viento o por salpicaduras de lluvia, y estas esporas pueden sobrevivir el invierno en residuos de cultivos, hasta que las condiciones son favorables para germinar (Abbas *et al.*, 2021). Por otro lado, *Fusarium solani* ataca principalmente a las plantas en la zona de la base del tallo y raíz (Martínez-Martínez *et al.*, 2020), lo que ocasiona marchitez y amarillamiento de las hojas, y hace que se retrase el crecimiento (Martínez-Solórzano *et al.*, 2020). Bajo condiciones de alta humedad y temperatura de más de 20 °C en el suelo, las plantas se vuelven quebradizas, cuando el ataque de *F. solani* llega a ser severo. Este patógeno sobrevive en el suelo en restos del cultivo y en plantas vivas, y la maquinaria agrícola puede jugar un papel importante en su propagación (Reyes-Tena *et al.*, 2019). Para el control de estos hongos fitopatógenos se utilizan principalmente fungicidas químicos sintéticos, los cuales, aunque son efectivos, pueden propiciar la generación de resistencia de los hongos hacia el compuesto activo, riesgos para la salud humana y para el ambiente (Abdel-Monaim *et al.*, 2011; Mantecón, 2015). Por lo tanto, se han buscado alternativas más amigables con el ambiente, especialmente compuestos de origen vegetal.

Las plantas sintetizan fitoquímicos entre ellos fitoanticipinas o fitoalexinas, las cuales desempeñan un papel importante en el crecimiento y reproducción de las plantas, de modo que atraen polinizadores y como protección frente a depredadores. Así mismo, contribuyen a las características morfológicas y sensoriales de las plantas y subproductos (Takshak y Agrawal, 2019; Singh y Chandrawat, 2017). El grupo fitoquímico que más se ha estudiado son los compuestos fenólicos (Andrade-Andrade



attracting pollinators and protecting against predators. They also contribute to the morphological and sensory characteristics of plants and plant by-products (Takshak and Agrawal, 2019; Singh and Chandrawat, 2017). The phytochemical group that has been most studied is that of phenolic compounds (Andrade-Andrade *et al.*, 2018), which can inhibit the germination of spores and the growth of fungi (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020; Joaquín-Ramos *et al.*, 2020; Oufensou *et al.*, 2020). These compounds are synthesized through the shikimate, polyketide and mevalonate pathways, and are characterized by the presence of one or more hydroxyl groups (-OH) attached to a 6-carbon aromatic ring (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). Polyphenols derived from phenylalanine or benzoic acid have one or more phenol groups (Mutha *et al.*, 2021). One of the characteristics of these compounds is their antioxidant activity or ability to counteract free radicals by chelating metal ions that are involved in their production. In addition, these compounds have ability to donate a hydrogen anion (an unpaired electron) and relocate it within the aromatic structure (García *et al.*, 2019). Among polyphenols, flavonoids comprise some of the most important compounds. They are subdivided into Flavonols, Flavones, Catechins, Flavanones, Anthocyanidins, and Isoflavones (Mutha *et al.*, 2021).

The biological activity (antimicrobial, antiviral, anticancer, etc.) attributed to polyphenols has given rise to a large number of studies focused on extracting them from various plant sources (Zhang *et al.*, 2022). However, the biological potential of polyphenols is limited by their low solubility and stability against environmental factors such as light, high temperatures (>50 °C) and changes in pH (Costa *et al.*, 2021). Generally, the extraction of these compounds is carried out through conventional techniques such as Soxhlet,

*et al.*, 2018) que tienen capacidad para inhibir la germinación de esporas y el crecimiento de hongos (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020; Joaquín-Ramos *et al.*, 2020; Oufensou *et al.*, 2020). Estos compuestos son sintetizados por las vías shikimato, policétido y mevalonato, y se caracterizan por la presencia de uno o varios grupos hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático de 6 carbonos (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). Los polifenoles cuentan con uno o más grupos fenoles al derivar de la fenilalanina u ácido benzoico (Mutha *et al.*, 2021). Una de las características de estos compuestos es su propiedad antioxidante o capacidad para contrarrestar radicales libres, mediante quelado de iones de metales que intervienen en su producción, y a su capacidad para donar un anión de hidrógeno, un electrón no apareado, y reubicarlo dentro de la estructura aromática (García *et al.*, 2019). Dentro de la clasificación de los polifenoles, destacan los flavonoides, los cuales se subdividen en Flavonoles, Flavonas, Catequinas, Flavanonas, Antocianidinas e Isoflavonas (Mutha *et al.*, 2021).

Las actividades biológicas (antimicrobianas, antiviral, anticancerígena, etc.) atribuidas a los polifenoles, han dado lugar a un gran número de estudios enfocados a su extracción a partir de diversas fuentes vegetales (Zhang *et al.*, 2022). Por otra parte, el potencial biológico de los polifenoles se encuentra limitado por su baja solubilidad y estabilidad frente a factores ambientales tales como: luz, temperaturas elevadas (>50 °C) y a cambios de pH (Costa *et al.*, 2021). Generalmente, la extracción de estos compuestos se realiza a través de técnicas convencionales tales como Soxhlet, percolación, maceraciones, infusiones, etc., las cuales están asociadas a un alto consumo de solventes orgánicos, algunos de los cuales poco amigables para el medio ambiente, y cuyos remanentes limitan la aplicación industrial de los extractos, además estas técnicas convencionales requieren tiempos

percolation, maceration, infusions, etc. These techniques are associated with a high consumption of organic solvents, some of which are unfriendly to the environment, which limits the industrial extraction of those compounds. Furthermore, conventional techniques require long extraction times, involving high energy consumption (Soto-García *et al.*, 2016) as well as considerable time and effort (Chemat *et al.*, 2019). In recent decades, alternative techniques have been proposed for the extraction of polyphenols, including the use of microwaves, by which electromagnetic radiation is used to heat vegetal material, which increases the permeability of cell membranes (Bocker and Silva, 2022). Another alternative technique is ultrasound which, through cavitation, increases the mass transfer and speed of chemical reactions, promoting cell lysis and the separation of cell debris by the cohesive forces of solvent molecules (Chemat *et al.*, 2017). The extraction of polyphenols has been carried out by ultrasound or microwave (Chemat *et al.*, 2019), either one or the other (Chemat *et al.*, 2017), or sequentially (Valdés *et al.*, 2021). However, there are few studies where these processes have been used simultaneously for the extraction of polyphenols. The present study had the following objectives: 1. To extract polyphenols from the leaves of Creosote bush (*Larrea tridentata*), Tarbush (*Flourensia cernua*) and Soursop (*Annona muricata*) through the simultaneous use of ultrasound and microwaves, with different m/v ratios and water and ethanol as solvents, and 2. To determine how much these polyphenols inhibit the mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** Leaves of soursop (*Annona muricata*), Creosote bush (*Larrea tridentata*),

largos de extracción, implicando un alto consumo energético (Soto-García *et al.*, 2016), y suelen ser laboriosas (Chemat *et al.*, 2019). En las últimas décadas se han propuesto técnicas alternativas para la extracción de polifenoles, dentro de las que destacan el uso de microondas, donde se emplean radiaciones electromagnéticas para generar calor dentro del material vegetal, haciendo más permeables las membranas celulares (Bocker y Silva, 2022) y el ultrasonido que gracias a la cavitación, permite el incremento de transferencia de masa y velocidad de las reacciones químicas, lo que genera lisis celular y separación de los restos celulares por las fuerzas de cohesión del líquido (Chemat *et al.*, 2017). La extracción de polifenoles se ha realizado por ultrasonido o microondas (Chemat *et al.*, 2019), ya sea utilizando uno u otro proceso (Chemat *et al.*, 2017), o bien de forma secuencial (Valdés *et al.*, 2021), sin embargo, son pocos los estudios donde se usan estos procesos simultáneamente para la extracción de polifenoles. Bajo esta perspectiva, el presente estudio tuvo como objetivos: 1. Extraer polifenoles de hojas de gobernadora, hojasén y guanábana, utilizando simultáneamente ultrasonido-microondas, diferentes relaciones m/v y agua y etanol como disolventes y 2. Determinar la inhibición de crecimiento micelial de *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* por estos polifenoles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Hojas de guanábana (*Annona muricata*), gobernadora (*Larrea tridentata*), y hojasén (*Flourensia cernua*) se usaron para la extracción de polifenoles. Las hojas de guanábana de la marca “Frutas Nayarit” se adquirieron en un local de Saltillo Coahuila, México, mientras que las hojas de gobernadora y hojasén se recolectaron en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Buenavista,

and Tarbush (*Flourensia cernua*) were used for the extraction of polyphenols. Soursop leaves from “Frutas Nayarit” were purchased at a store in Saltillo, Coahuila, Mexico, while the leaves of Creosote bush and Tarbush were collected at the Experimental Station of the Antonio Narro Autonomous Agrarian University (UAAAN) in Buenavista, Coahuila, Mexico. Healthy leaves were then selected, discarding those that had damage or malformations, likewise, all contaminants found in the samples were also discarded. The selected leaves were then dehydrated for 3 days at room temperature and for 24 h in a desiccator (NWT-5, Northwest Technology®, Italy). Subsequently, the dry material was ground into powder in a Biobase mill (MD-120) and then sieved using an 850 µm mesh, number 20 (W.S. TAYLER®) (Valdez-Guerrero *et al.*, 2021).

**Preparation of extracts and extraction of phytochemicals.** The extracts were prepared using distilled water and mixtures of ethanol/distilled water (70/30 and 30/70). Different ratios (m/v) between mass (plant material) and volume ((quantity and concentration of the solvent) were used). Specifically, m/v ratios of 1:8, 1:12 and 1:16 were used, following the method of Valdez-Guerrero *et al.* (2021) with minor modifications. The five (CA, CB, CC, CD and CE) solutions produced from each plant material under these conditions (Table 1) were placed in a glass reactor (1 L) and ultrasound and microwave processes were simultaneously applied using an Ultrasonic equipment (Microwave Cooperative Workstation XO-SM 400) with the following parameters: Ultrasonic (Power Radio - 20, Ultrasonic on Relay - 10, Ultrasonic off Relay -3, Amplitude off Relay - 25 and Set Time - 20) and Microwave (Power Radio - 800, Display power - 0, Set Temp - 70°C and Holding Time - 5). Subsequently, the extract was filtered to remove the bagasse.

Coahuila, México, posteriormente, se seleccionaron las hojas sanas, eliminando aquellas que tenían daños o malformaciones, así mismo, se desecharon los contaminantes en las muestras. Después, las hojas fueron deshidratadas por 3 días a temperatura ambiente y 24 h en un desecador (NWT-5, Northwest Technology®, Italy). A continuación, la materia prima fue molida en un molino Biobase, modelo MD-120, y el material vegetal en forma de polvo se tamizó utilizando mallas de 850 µm, número 20 (W.S. TAYLER®) (Valdez-Guerrero *et al.*, 2021).

**Preparación de extractos y extracción de fitoquímicos.** Para la obtención de los extractos, se empleó agua destilada y mezclas de etanol/agua destilada (70/30 y 30/70), además se emplearon diferentes relaciones (m/v) masa (material vegetal) volumen (cantidad y concentración del solvente), específicamente se usaron las relaciones (m/v), 1:8, 1:12 y 1:16 acorde a la metodología de Valdez-Guerrero *et al.* (2021), con modificaciones menores. Las cinco (CA, CB, CC, CD y CE) soluciones producidas de cada material vegetal bajo estas condiciones (Cuadro 1) se colocaron en un reactor de vidrio (1 L) y simultáneamente se aplicaron los procesos ultrasonido y microondas en un equipo Ultrasonic Microwave Cooperative Workstation XO-SM 400, bajo los siguientes parámetros: Ultrasonic (Power Radio - 20, Ultrasonic on Relay - 10, Ultrasonic off Relay -3, Amplitude off Relay - 25 y Set Time - 20) y Microwave (Power Radio - 800, Display power - 0, Set Temp - 70°C y Holding Time - 5). Posteriormente, el extracto se filtró para remover el bagazo.

**Purificación y fraccionado de polifenoles.** La metodología de Valdez-Guerrero *et al.* (2021) se empleó para la separación cromatográfica de los extractos. Primeramente, los extractos se filtraron usando papel Whatman No. 41, después, se separaron mediante cromatografía en columna de

**Table 1. Mass/volume ratios (m/v) and ethanol gradients. The conditions used to obtain polyphenols by ultrasound-microwave.****Cuadro 1. Relaciones masa/ volumen (m/v) y gradientes de etanol como condiciones utilizadas para la obtención de polifenoles por ultrasonido-microondas.**

| Factor           | Extraction condition |                            |                            |          |          |
|------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------|----------|
|                  | CA <sup>z</sup>      | CB                         | CC                         | CD       | CE       |
| Vegetal material | 62.5g                | 62.5g                      | 125g                       | 125g     | 83.33    |
| Solvent          | EtOH 70%             | distilled H <sub>2</sub> O | distilled H <sub>2</sub> O | EtOH 70% | EtOH 30% |
| m/v ratio        | 1:16                 | 1:16                       | 1:8                        | 1:8      | 1:12     |

<sup>z</sup>In the rest of the document these solutions will be referred to as the group of polyphenols. / <sup>z</sup>En el resto del documento se referirán como grupo de polifenoles.

### Purification and fractionation of polyphenols.

The method of Valdez-Guerrero *et al.* (2021) was used for the chromatographic separation of the extracts. The extracts were first filtered using Whatman No. 41 paper, then separated by ion exchange column chromatography, using 200g of amberlite (Amberlite XAD16N) as stationary phase and water and 96% ethanol as mobile phase. The sample was then decanted in the column, with Amberlite® (XAD 16N) resin (previously activated with methanol for 10 minutes) as stationary phase, and water (to remove water-soluble compounds) and ethanol (to recover the polyphenolic content) as eluents. The column was protected from light due to the photosensitivity of the compounds under study. The aqueous fraction was discarded when its color became clear. The ethanolic fraction was collected in an amber container. Once the ethanolic fraction was obtained, it was distributed into heat-resistant glass plates, which were left to dry at room temperature (25-30 °C) in the dark for 3 days. The dry extract was collected from the plates in an amber-colored bottle for later analysis. The chemical compounds found in each dry extract were identified as polyphenols associated with one of the five (CA, CB, CC, CD and CE) solutions of each plant material (Table 1).

intercambio iónico, usando como fase estacionaria 200g de amberlita (Amberlite XAD16N) y como fase móvil agua y etanol 96%. Luego se decantó la muestra en la columna empacada con la resina Amberlita® XAD 16N (previamente activada con metanol durante 10 minutos) como fase estacionaria y agua (para eliminar compuestos hidrosolubles) y etanol (para recuperar el contenido polifenólico) como eluentes. Cabe mencionar que la columna fue resguardada de la luz para prevenir la fotosensibilidad de los compuestos de interés. La fracción acuosa se desechó una vez que su coloración fue clara, mientras que la fracción etanólica se colectó en un envase ámbar. Una vez obtenida la fracción etanólica, ésta se repartió en refractarios de vidrio, los cuales se secaron a temperatura ambiente (25-30 °C), sin exponer a la luz durante 3 días. Finalmente se colectó el extracto seco de las cajas, en un frasco ámbar para su posterior análisis. A partir de este paso, los compuestos químicos de cada extracto seco se identificarán como grupo de polifenoles obtenido con alguna de las cinco (CA, CB, CC, CD y CE) soluciones de cada material vegetal (Cuadro 1).

### Determinación de polifenoles hidrolizables.

Los extractos en polvo se diluyeron en agua a un

#### **Determination of hydrolysable polyphenols.**

Powder extracts were diluted in water to a volume of 400  $\mu$ L. After adding 400  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent, the solution was left to stand for 5 min. Afterward, 400  $\mu$ L of 0.01 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  were added and the solution was allowed to react for 5 min. Then, 2.5 mL of distilled water were added and the solution was read at 790 nm in a UV-Vis Spectrophotometer ( Biomate) (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Determination of condensed polyphenols.** 500  $\mu$ L of sample were added to a tube, followed by 3 mL of 10% HCl-butanol. The resultant solution was stirred well. Subsequently, 100  $\mu$ L of the ferric reagent were added to the solution, stirring the mixture vigorously. The tubes were transferred to a water bath and boiled for one hour, making sure that the tubes were perfectly closed. Afterward, the samples were allowed to cool to room temperature (25-30 °C) and were then read at 460 nm in a UV-Vis Spectrophotometer (Biomate) (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Identification of polyphenols.** First, 10 mg of each powder extract were weighed and dissolved in 1 mL of methanol, sonicated for 5 min at room temperature and filtered through 0.45  $\mu$ m membranes. The samples were then placed in vials and put in an HPLC equipment (Varian Prostar 330 with UV-visible diode array detector) coupled to a mass detector (Varian 500-Ms). The chromatographic analysis was conducted using a flow rate of 0.2 mL/min, a Denali C18 reversed-phase column (150 mm  $\times$  2.1 mm, 3 $\mu$ m, Grace, Albany, OR USA), and a mass detection limit of 100 to 2000 m/z. All experiments were performed in negative-ion mode [M-H]. Nitrogen was used as nebulizer gas and helium as buffer gas. The ion source had the following parameters: spray

volumen de 400  $\mu$ L. Posteriormente, se le agregaron 400  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu, dejándose reposar por 5 min. Después, se le añadieron 400  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01 M, dejándose reaccionar por 5 min. Por último, se le agregaron 2.5 mL de agua destilada y se leyó la solución a 790 nm en el Espectrofotómetro UV-Vis marca Biomate (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Determinación de polifenoles condensados.** En un tubo se añadieron 500  $\mu$ L de muestra, después se le agregaron 3 mL de HCl-butanol al 10%, agitando muy bien la solución. Posteriormente, se le incorporaron a la solución, 100  $\mu$ L del reactivo férrico, agitando vigorosamente la mezcla. Los tubos se trasladaron a un baño para someterlos a ebullición durante una hora, asegurándose que los tubos estuvieran perfectamente cerrados. Después, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25-30 °C), y finalmente se leyeron a 460 nm en un Espectrofotómetro UV-Vis marca Biomate (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Identificación de polifenoles.** Primeramente, se pesaron 10 mg de cada extracto en polvo y se les disolvió en 1 mL de metanol, luego se sonicó por 5 min a temperatura ambiente, para posteriormente filtrar a través de membranas de 0.45  $\mu$ m y depositar la muestra en viales para luego colocarlas en un equipo HPLC (marca Varian Prostar, modelo 330 con detector UV-visible de arreglo de diodos), acoplado a un detector de masas (marca Varian, modelo 500-Ms). Se empleó un flujo de 0.2 mL/min, una columna Denali C18 fase reversa (150 mm  $\times$  2.1 mm, 3 $\mu$ m, Grace, Albany, OR USA), así como un límite de detección de masas de 100 a 2000 m/z. Todos los experimentos fueron realizados en el modo negativo y [M-H] se empleó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. La fuente de iones tuvo los siguientes parámetros: vol-

voltage (5.0 kV), capillary voltage (90.0 V), and temperature (350 °C). The data was collected and processed using the M.S. Workstation software (V.6.9). The samples were first analyzed in full scan mode at a mass-to-charge ratio (m/z) in the range of 50–2000. Tandem mass spectrometry analysis (MS/MS) was performed on a series of selected precursor ions. The obtained compounds were compared using a bioactive compound database (WorkStation database version 2.0, VARIAN, Palo Alto, CA, USA).

**Isolation of phytopathogenic fungi.** The phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and *Alternaria alternata* were isolated from diseased plants (yellowing, curling of the leaves, scabs, stem and fruit rot). Five-millimeter pieces of plant material were cut from the diseased plants. The pieces were disinfected with NaClO (2%) for 1 min, then immersed twice in sterile distilled water for 1 min and placed in Petri dishes with PDA medium (Difco™), which were incubated at 28±2 °C for 7 days. After the germination of monosporic cultures, fungi with characteristics of *A. alternata* and *F. solani* were purified by hyphal tip (Morales *et al.*, 2007). The taxonomic identification of the species was based on observations of the growth of the fungal colonies in the culture medium to determine their pigmentation, shape and growth speed, as well as the formation of sporodochia, the number of septa in the conidia, the presence of chlamydospores, and the shape of conidia (micro and macroconidia). The specific identification was done with a compound microscope (10x, 40x and 100x), observing slides with morphological structures and taxonomic characteristics typical of the species, according to the taxonomic keys of Simmons (2007) for *A. alternata*, and of Leslie and Summerell (2006) for *Fusarium solani*.

taje de pulverización (5,0 kV), voltaje capilar (90,0 V), y temperatura (350 °C). Los datos fueron recolectados y procesados usando el M.S. Workstation software (V 6.9). Las muestras se analizaron en primer lugar en modo de exploración completa adquirida en el rango m/z 50–2000. Los análisis MS/MS se realizaron en una serie de iones precursores seleccionados. Por último, los compuestos se compararon utilizando una base de datos de compuestos bioactivos (base de datos WorkStation versión 2.0, VARIAN, Palo Alto, CA, EE. UU.).

**Aislamiento de hongos fitopatógenos.** Los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y *Alternaria alternata* se aislaron de plantas enfermas (amarillamiento, encorvamiento de las hojas, roñas, pudrición en tallo y fruto). Del material enfermo, se cortaron trozos de 5 mm de material vegetal, posteriormente se desinfectó con NaClO al 2% por 1 min, después se sumergió en agua destilada estéril por 1 min dos veces, para finalmente colocarlos en cajas Petri con medio PDA (Difco™), las cuales se incubaron a 28±2 °C durante 7 días. Después de la germinación de cultivos monospóricos, los hongos con características de *A. alternata* y *F. solani* fueron purificados por medio de punta de hifa (Morales *et al.*, 2007). Para la determinación taxonómica de las especies, se realizó observaciones del crecimiento de las colonias fúngicas en el medio de cultivo para determinar la pigmentación, la forma y la velocidad del crecimiento de las colonias, la formación de esporodocios y el número de septos en los conidios; la presencia de clamidosporas y la forma de conidias (micro y macroconidios). La identificación específica se realizó bajo microscopio compuesto (10x, 40X y 100x) al observar laminillas con estructuras morfológicas y criterios taxonómicos propios de la especie, empleando las claves taxonómicas de Simmons (2007) para *A.*

**Preliminary determination of the polyphenol concentration.** A preliminary test was carried out to determine the inhibitory effect of the concentration (6000, 8000 and 10000 ppm) of two groups of polyphenols (CD = m/v (1:8) and EtOH-70%, and CE= m/v (1:12) and EtOH-30%) from *Larrea tridentata* on the mycelial growth of *Fusarium solani*, compared to the following three controls: 1) without polyphenols (negative); 2) EtOH 70% (positive); 3) fungicide [Tecto<sup>R</sup> 60 at 1% ] (positive). The evaluation was carried out under a completely randomized design with three replications, using 100 x 20 mm Petri dishes with PDA agar (Difco<sup>TM</sup>). Five hundred microliters of each concentration of each group of polyphenols (CD and CE) suspended in 70% ethanol were added separately to each dish, including the three control treatments. The polyphenols were spread over the entire surface of the agar with the help of a glass rod adapted to the size of the Petri dish. They were left to stand for 30 min, during which time the polyphenols were absorbed into the agar. A 0.5 cm diameter disk with *F. solani* mycelium was then placed inside each Petri dish (Berlanga-Padilla *et al.*, 2011). The dishes were sealed and incubated at 25 °C until the mycelium of the negative control completely covered the dish. At that time, the colony diameter of each treatment (9 treatments) was measured. The arrangement of the Petri dishes in the incubator allowed for a completely randomized experimental design. Colony diameter values were converted into inhibition percentages (ICM), proportional to control 1, using the following mathematical expression (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017):

$$\text{ICM (\%)} = [(dTa - dt)/dTa] \times 100$$

Where dTa and dt represent the diameter of the mycelial growth of control 1 and of each of the other treatments, respectively.

*alternata*, y de Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium solani*.

**Determinación preliminar de la concentración de polifenoles.** Se realizó un ensayo preliminar para determinar el efecto de la concentración (6000, 8000 y 10000 ppm) de dos grupos de polifenoles (CD = m/v (1:8) y EtOH-70%, y CE= m/v (1:12) y EtOH-30%) de *Larrea tridentata*, sobre la inhibición micelial de *Fusarium solani* vs tres testigos, 1) sin polifenoles (negativo), 2) EtOH 70% (positivo) y 3) fungicida [Tecto<sup>R</sup> 60 al 1%] (positivo). La evaluación se realizó bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones, utilizando cajas Petri de 100 x 20 mm con agar PDA (Difco<sup>TM</sup>). A cada caja se le agregó por separado, 500 µL de cada concentración especificada de cada grupo de polifenoles (CD y CE) suspendidos en etanol al 70%, y se incluyeron los tres tratamientos testigo. Los polifenoles se extendieron por toda la superficie del agar con la ayuda de una varilla de vidrio adaptada al tamaño de la caja Petri. Se dejó en reposo durante 30 min, tiempo en el cual los polifenoles se absorbieron en el agar, y en seguida se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro con micelio de *F. solani* (Berlanga-Padilla *et al.*, 2011). Las cajas se sellaron e incubaron a 25 °C, hasta que el micelio creciendo con el testigo negativo, cubrió totalmente la caja. En ese momento se midió el diámetro de la colonia de cada tratamiento (9 tratamientos). La disposición de las cajas de Petri en la incubadora permitió tener un diseño experimental completamente al azar. Dicho diámetro fue convertido a porcentaje de inhibición (ICM), en relación con el testigo 1 por la siguiente expresión matemática (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017):

$$\text{ICM (\%)} = [(dTa - dt)/dTa] \times 100$$

Donde dTa y dt representan el diámetro del crecimiento micelial del testigo 1 y de cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente.

Based on the results of the preliminary assay, the concentration of 8000 ppm was selected to evaluate the groups of polyphenols (CA, CB, CC, CD and CE) obtained from Tarbush, Creosote bush and Soursop. Sowing and temperature conditions were similar to those used in the preliminary study. All groups of polyphenols were evaluated against *F. solani* and *A. alternata*. The controls for *Fusarium* were: 1) without polyphenols (negative); 2) EtOH 70% (positive); 3) fungicide [TectoR 60 at 1%] (positive). The controls for *Alternaria* were: 1) without polyphenols (negative); 2) EtOH 70% (positive). The response variable was mycelial growth, converted to inhibition percentage using the formula indicated above (ICM).

**Statistical analysis.** The data resulting from all the bioassays were analyzed using an analysis of variance. The significance was determined with a probability of  $p < 0.05$ . When necessary, the means of the treatments were compared using the Tukey test. All statistical analyses were performed using SAS software (version 9.0).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Preliminary determination of the polyphenol concentration.** The analysis of variance showed no differences ( $P < 0.00001$ ) in mycelial inhibition between the concentrations of each of the two groups of polyphenols (CD and CE) obtained from Creosote bush. However, the inhibition of mycelial growth did show differences between the two groups of polyphenols and between these groups and the negative control (Figure 1) ( $P < 0.00001$ ). The mycelial inhibition was greater in *Fusarium solani* when using the CD polyphenol group (obtained with a ratio of m/v 1:8 and 70% ethanol). With the CD polyphenol group, the range

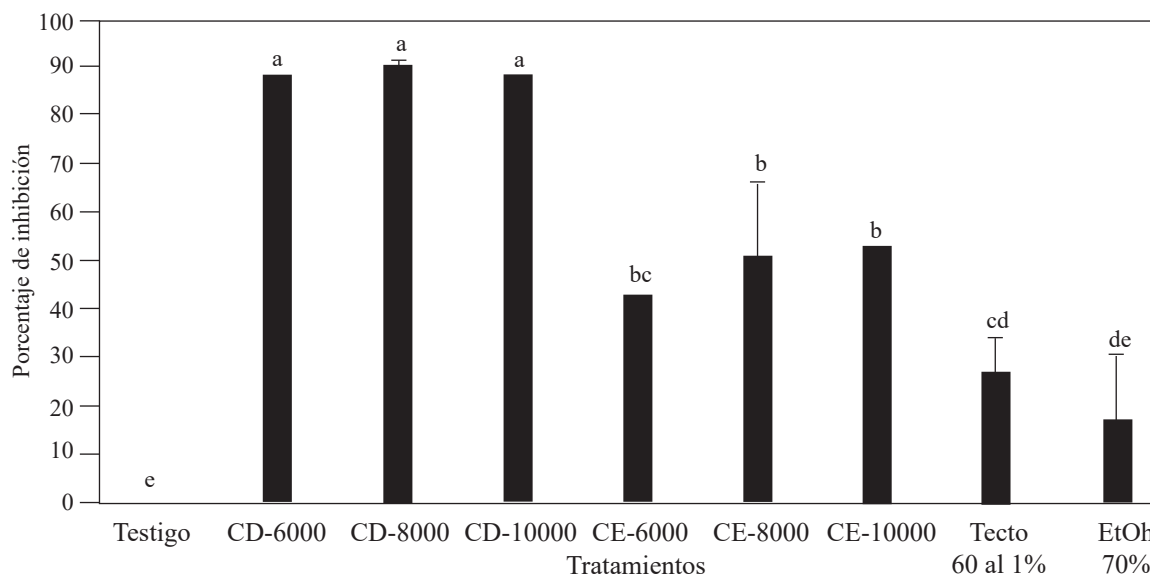
Después de analizar en el ensayo preliminar el efecto de concentración, se seleccionó la concentración de 8000 ppm para evaluar los grupos de polifenoles (CA, CB, CC, CD y CE) obtenidos de hojaseñ, gobernadora y guanábana. Las condiciones de siembra y de temperatura fueron similares a las empleadas en el estudio preliminar. Todos los grupos de polifenoles fueron evaluados contra *F. solani* y *A. alternata*; y se usaron como testigos para *Fusarium* 1) sin polifenoles (negativo), 2) EtOH 70% (positivo) y 3) fungicida [Tecto<sup>R</sup> 60 al 1%] (positivo). Mientras que para *Alternaria* como testigo se empleó: 1) sin polifenoles (negativo) y 2) EtOH 70% (positivo). La variable de respuesta fue crecimiento micelial, convertido a porcentaje de inhibición de igual manera por la fórmula señalada anteriormente (ICM).

**Análisis estadísticos.** Los datos resultantes de todos los bioensayos fueron analizados utilizando el análisis de varianza, y la significancia se determinó con una probabilidad de ( $p < 0.05$ ), cuando fue necesario, las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software SAS (versión 9.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Determinación preliminar de la concentración de polifenoles.** El análisis de varianza no mostró diferencias ( $P < 0.00001$ ) en la inhibición micelial entre las concentraciones dentro de cada uno de los dos grupos de polifenoles (CD y CE) obtenidos de gobernadora. Sin embargo, si se observó que la inhibición del crecimiento micelial fue diferente entre los dos grupos de polifenoles y entre estos grupos y el testigo negativo (Figura 1) ( $P < 0.00001$ ). Se apreció que la inhibición micelial de *Fusarium*





**Figure 1.** Growth inhibition percentage against *Fusarium solani* by different concentrations (ppm) of polyphenols from Creosote bush (*Larrea tridentata*) obtained with different m/v ratios and ethanol concentrations and using ultrasound-microwaves. Groups of CD polyphenols obtained with the m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%, and CE polyphenols obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%. Columns with the same letter are not different according to Tukey's multiple range test.

**Figura 1.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por diferente concentración (ppm) de polifenoles de gobernadora (*Larrea tridentata*) obtenidos con diferentes relaciones m/v y concentraciones de etanol, y usando ultrasonido-microondas. Grupos de polifenoles CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70% y CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%. Columnas con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

of mycelial inhibition varied between 88 and 90%. In contrast, the group of polyphenols obtained with an m/v ratio of 1:12 and 30% ethanol only inhibited between 43 and 50% of mycelial growth, while the positive control (Tecto 60® (thiabendazole) at 1% inhibited only 27% of *F. solani* mycelial growth.

The results show that the polyphenols obtained from Creosote bush leaves by ultrasound-microwave have biological activity against the fungus *F. solani*. Four groups were formed based on the percentage of mycelial growth inhibition: a group formed by the negative control (without polyphenols), another formed by the positive control (Tecto 60® (thiabendazole) at 1%, and another two formed by the polyphenolic groups CD and CE. This coincides with what was reported by Peñuelas-Rubio *et al.* (2017), who mention that

*solani* fue mayor cuando se usó el grupo de polifenoles CD (obtenido con una relación de m/v 1:8 y etanol al 70%), el rango de afectación en la respuesta del crecimiento micelial con el grupo de polifenoles CD varió entre 88 - 90 %. En contraste el grupo de polifenoles obtenidos con la relación m/v de 1:12 y etanol al 30% solo inhibió el crecimiento micelial entre 43-50%, mientras que el testigo positivo (Tecto 60® (tiabendazol) al 1%) solo inhibió el crecimiento micelial de *F. solani* en 27%.

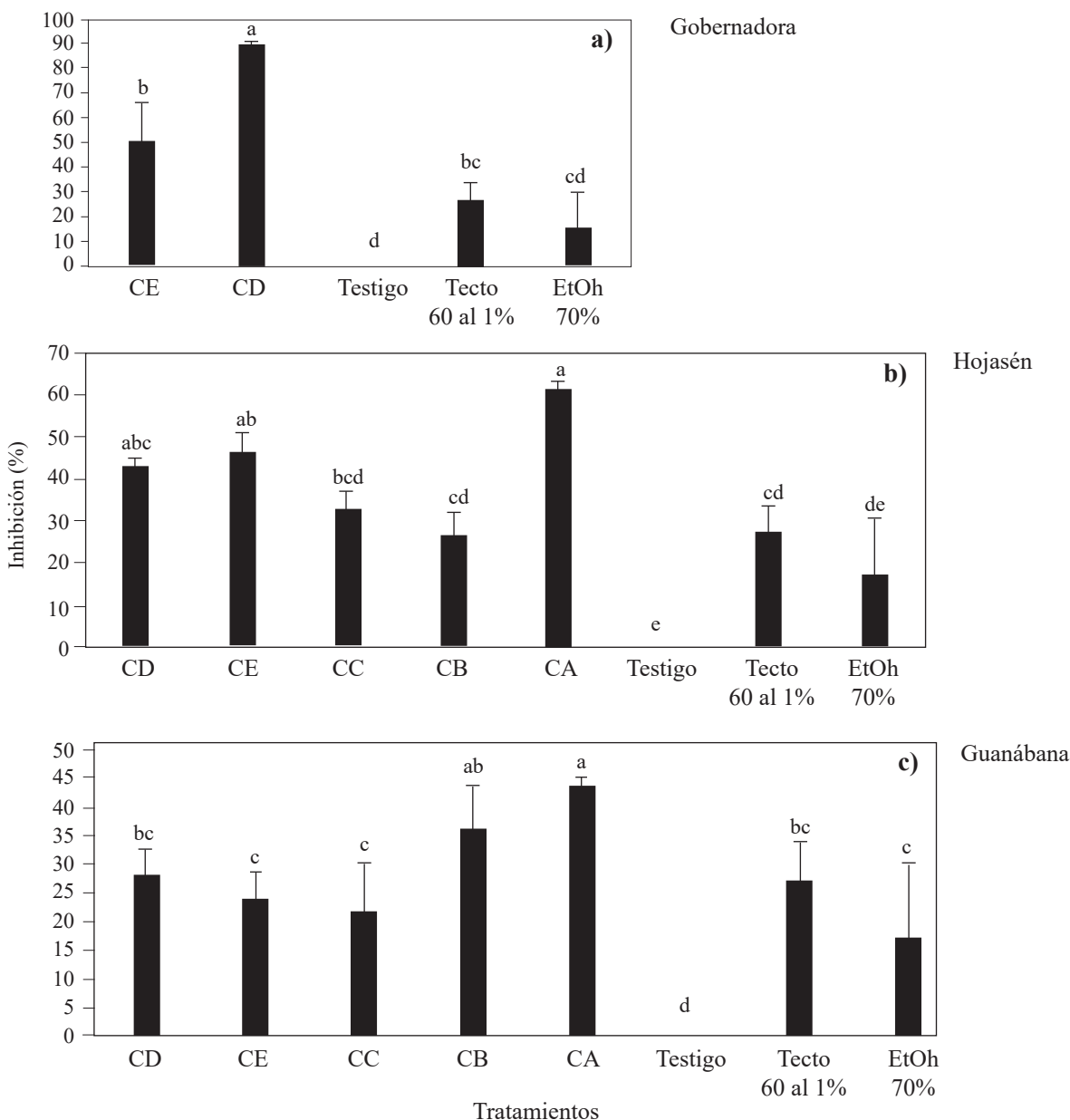
Los resultados muestran que hay actividad biológica de los polifenoles obtenidos de hojas de gobernadora por ultrasonido-microondas contra el hongo *F. solani*, donde por el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se formaron 4 grupos: un grupo formado por el testigo negativo (sin polifenoles), otro integrado por el testigo positivo (Tecto 60®

the inhibitory effect of fungal growth by extracts of *L. tridentata* can be attributed to the fact that the phenolic substances present in the extracts react with fungal enzymes, rendering them catalytically inactive. Farag *et al.* (2011) suggest that extracts with high amounts of polyphenols prevent the development of *F. oxysporum* due to the reduction of lipid peroxidation levels. In the present study, fungal growth inhibition was observed to be greater with the CD polyphenol group than with the CE group, which could be due to the presence of different polyphenolic compounds in each extract (Oufensou *et al.*, 2020).

**Inhibition of *Fusarium* and *Alternaria* by polyphenols from Creosote bush, Tarbush and Soursop.** In the case of *Fusarium*, the analysis of variance showed differences in mycelial growth inhibition against *F. solani* between the two groups of polyphenols (CD and CE) obtained from Creosote bush (*L. tridentata*) and the controls (negative and positive; tecto-60® and ethanol-70%) (Figure 2a). It was observed that at 8000 ppm the polyphenols obtained with the 1:8 m/v ratio and 70% ethanol (CD), inhibited mycelial growth by 90%, while the polyphenols obtained with the 1:12 m/v ratio and ethanol 30%, and the positive control (Tecto 60® (thiabendazole) at 1%) only inhibited mycelial growth by 50% and 27%, respectively. The results of this study coincide with those reported by Peñuelas-Rubio *et al.* (2017) who mention that extracts at 500 ppm and obtained by the Soxhlet system and 70% ethanol, inhibited *F. oxysporum* by 98%, however, in the present work 8000 ppm of polyphenols were needed to inhibit mycelial growth by 90%, when the polyphenols were extracted with EtOH-70% and 50% when EtOH-30% was used. In this study, polyphenols were extracted in 20 minutes using simultaneously ultrasound-microwave, while extraction using

(tiabendazol) al 1%), y otro por los grupos polifenólicos CD y CE, lo cual coincide con lo reportado con Peñuelas-Rubio *et al.* (2017), quienes mencionan que el efecto inhibitorio del crecimiento fúngico por los extractos de *L. tridentata*, puede atribuirse a que las sustancias fenólicas presentes en los extractos, reaccionan con las enzimas fúngicas, volviéndolas catalíticamente inactivas. Farag *et al.* (2011), sugieren que los extractos con altas cantidades de polifenoles previenen el desarrollo de *F. oxysporum* debido a la reducción de los niveles de peroxidación lipídica. Por otra parte, en el presente estudio se apreció la inhibición en el crecimiento fúngico fue mayor con el grupo de polifenoles CD que cuando se usó el grupo CE, esto puede ser debido a la presencia de diferentes compuestos polifenólicos en cada extracto (Oufensou *et al.*, 2020).

**Inhibición de *Fusarium* y *Alternaria* por polifenoles de gobernadora, hojasén y guanábana.** Para *Fusarium*, el análisis de varianza mostró diferencias en la inhibición micelial de *F. solani* entre los dos grupos de polifenoles (CD y CE) obtenidos de gobernadora (*L. tridentata*) vs testigos (negativo y positivo (tecto-60® y etanol-70%)) (Figura 2a). Se apreció que a 8000 ppm los polifenoles obtenidos con la relación m/v 1:8 y etanol 70% (CD), inhibieron el crecimiento micelial en 90 %, mientras que los polifenoles obtenidos con la relación m/v 1:12 y etanol 30%, y el testigo positivo (Tecto 60® (tiabendazol) al 1%) solo inhibieron el crecimiento micelial en 50% y 27 %, respectivamente. Los resultados de este estudio coinciden con los reportados por Peñuelas-Rubio *et al.* (2017) quienes mencionan que extractos a 500 ppm y obtenidos por el sistema Soxhlet y etanol 70%, inhibieron *F. oxysporum* en un 98%, sin embargo, en el presente trabajo se necesitaron 8000 ppm de polifenoles para inhibir el crecimiento micelial en 90%, cuando los polifenoles se extrajeron con EtOH-70% y



**Figure 2.** Mycelial growth inhibition against *Fusarium solani* by different groups of polyphenols from a) Creosote bush (*Larrea tridentata*), b) Tarbush (*Flourensia cernua*) and c) Soursop (*Annona muricata*) obtained by ultrasound-microwave, at a concentration of 8000 ppm, compared to controls (negative and positive; tecto- 60® and ethanol-70%). Polyphenol group CA obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%; polyphenol group CB obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-0%; polyphenol group CC obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-0%; polyphenol group CD obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%; polyphenol group CE obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%. Columns with the same letter within the same graph are not different according to Tukey's multiple range test.

**Figura 2.** Inhibición micelial de *Fusarium solani* por diferentes grupos de polifenoles de a) gobernadora (*Larrea tridentata*), b) hojasén (*Flourensia cernua*) y c) guanábana (*Annona muricata*) a 8000 ppm obtenidos por ultrasonido-microondas vs testigos (negativo y positivo (tecto-60® y etanol-70%). Grupos de polifenoles CA obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, CB obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-0%, CC obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-0%, CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70%, CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%. Columnas con la misma letra dentro de una misma grafica no son diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Soxhlet takes at least 36 hours (Sepúlveda-Rincón *et al.*, 2016).

In the case of Tarbush (*F. cernua*), the analysis of variance showed significant differences in mycelial growth inhibition against *F. solani* between the different groups of polyphenols and the negative control (Figure 2b). The polyphenol groups (CA, CC, CD and CE) inhibited a greater proportion of mycelial growth than the positive control (tecto-60®). The groups of polyphenols extracted using ethanol as solvent (CA, CD and CE) had a greater inhibitory effect on mycelial growth, followed by the groups of polyphenols obtained using water (CB and CC). The inhibition efficiency of the polyphenolic groups extracted with ethanol was proportional to the m/v ratio, that is, polyphenols with a higher m/v ratio were associated with greater fungal growth inhibition. The inhibition percentage of the groups of polyphenols extracted with water was similar to that of the positive control (Tecto-60®). The group of polyphenols that had a greater inhibitory effect (60%) was the one obtained with 70% ethanol and an m/v ratio of 1:16 (CA), followed by the groups of polyphenols CE and CD, with 46.5 and 42.8%, respectively. The inhibition percentage of the polyphenols obtained with water (CC and CB) was very similar to the inhibition percentage associated with the positive control (Tecto-60®), 32 and 26%, respectively.

There are few studies on the effect of extracts of *F. cernua* against *F. solani*. Most studies have used *F. oxysporum*. The mycelial inhibition percentage of the polyphenolic groups of *F. cernua* studied here was greater than that reported by Gamboa-Alvarado *et al.* (2003), who did not find any inhibitory effect against *F. oxysporum* with any of the extract concentrations that they studied (4000, 8000, 12000, 16000 and 20000 ppm). This can be explained by the method (Soxhlet extraction) and

50% cuando se usó EtOH-30%. En este estudio los polifenoles se extrajeron en 20 minutos usando simultáneamente ultrasonido-microondas, mientras que la extracción empleando Soxhlet tarda al menos 36 horas (Sepúlveda-Rincón *et al.*, 2016).

Respecto a hojaseñ (*F. cernua*), el análisis de varianza mostró diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* entre los diferentes grupos de polifenoles vs el testigo negativo (Figura 2b). Los grupos de polifenoles (CA, CC, CD y CE) inhibieron en una mayor proporción que el testigo positivo (tecto-60®). Se apreció que los grupos de polifenoles extraídos usando etanol como disolvente (CA, CD y CE) tuvieron mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial, seguidos por los grupos de polifenoles obtenidos empleando agua (CB y CC). Así mismo, se observó que la eficiencia en la inhibición por los grupos polifenólicos extraídos con etanol, es proporcional a la relación m/v, es decir, los polifenoles con mayor relación m/v promueven más la inhibición fúngica. Mientras que los grupos de polifenoles extraídos con agua inhibieron de manera similar al testigo positivo (Tecto-60®). En este sentido el grupo de polifenoles que más afectó la inhibición fue el obtenido con etanol al 70% en la relación m/v 1:16 (CA) con un valor superior a 60% de inhibición, seguido de los grupos de polifenoles CE y CD con 46.5 y 42.8%, respectivamente. Los polifenoles obtenidos empleando agua (CC y CB) presentaron un porcentaje de inhibición muy similar al testigo positivo (Tecto-60®), con valores de 32% y 26 %, respectivamente.

Son escasos los estudios que involucran los extractos de *F. cernua* contra *F. solani* y en su mayoría se ha trabajado con *F. oxysporum*. Por otra parte, el porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial observado con los grupos polifenólicos de *F. cernua* en este estudio, son mayores a lo reportado por Gamboa-Alvarado *et al.* (2003),

solvent (methanol) used by Gamboa-Alvarado *et al.* (2003). They used a 10-day-long extraction method that turned out to be less efficient and effective than ultrasound-microwave technology, which achieves extraction in 20 minutes and with a more controlled and efficient mass transfer. There are reports of complete inhibition of *Fusarium* growth using extracts from tarbush, however, these results were against *F. oxysporum* (Peñuelas *et al.*, 2017).

Concerning the polyphenolic groups from soursop (*A. muricata*), the analysis of variance showed that, at 8000 ppm, there were significant differences among treatments (Figure 2c). The groups of polyphenols CA and CB showed a greater inhibitory effect against fungal growth, even greater than the positive controls (Tecto-60® and 70% ethanol). In addition, the polyphenols obtained with an m/v ratio of 1:16 had a greater inhibitory effect against *F. solani*, regardless of whether they were obtained with ethanol or water. The CA group of polyphenolic compounds showed the greatest inhibitory effect (43.7%) against the mycelial growth of *F. solani*. This group of polyphenols was obtained with an m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%. The CA group was followed by the groups of polyphenolic compounds CB and CD, with 36 and 27% of inhibition, respectively. The CE and CC polyphenol groups caused a lower percentage of inhibition than the positive control (Tecto-60®), 23 and 21%, respectively. Although soursop polyphenols showed a higher inhibitory effect against *F. solani* than the positive control (Tecto-60®), the growth of this fungus was not inhibited by more than 50% at a concentration of 8000 ppm. Thus, the fungicidal potential of these polyphenols should be tested at higher concentrations (Figure 2c). It was not possible to find reports about the antifungal properties of polyphenols obtained from soursop against

quienes no encontraron ningún efecto inhibitorio del crecimiento de *F. oxysporum* en ninguna de las concentraciones de 4,000, 8,000, 12,000, 16,000 y 20,000 ppm del extracto. Esto puede ser explicado por el método (extracción Soxhlet) y disolvente (metanol) empleados por Gamboa-Alvarado *et al.* (2003), quienes utilizaron un sistema de extracción con una duración de 10 días, el cual resulta ser menos eficiente y efectivo que la tecnología de ultrasonido-microondas, que logra la extracción en 20 minutos y con una transferencia de masa más controlada y eficiente. Hay reportes de inhibición completa de *Fusarium* utilizando extractos de hojásén, sin embargo, estos reportes son contra *F. oxysporum* (Peñuelas *et al.*, 2017).

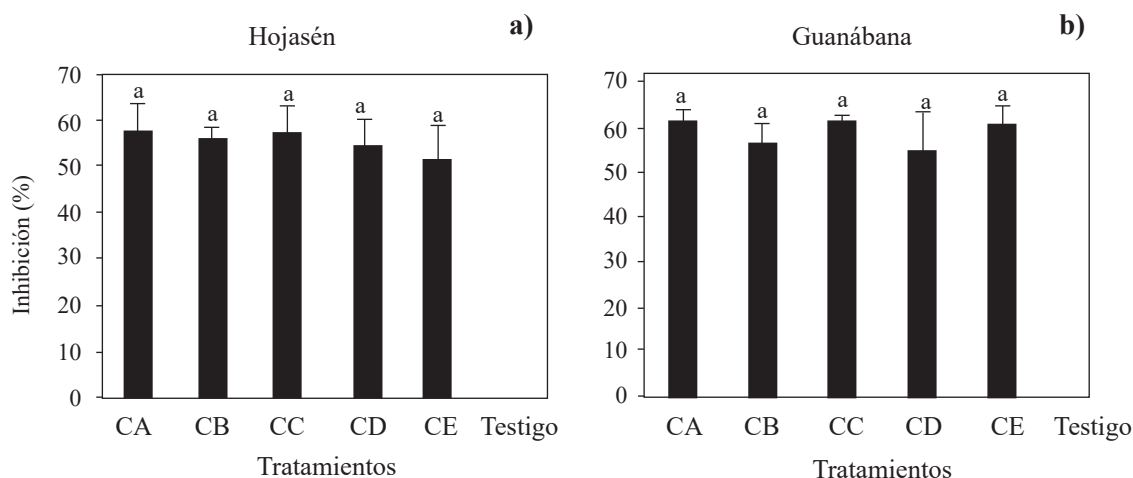
Para los grupos polifenólicos de guanábana (*A. muricata*) a 8000 ppm, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2c). Se apreció que los grupos de polifenoles CA y CB presentaron una mayor inhibición del crecimiento fúngico, el cual fue aún mayor que los testigos positivos (Tecto-60® y etanol 70%). Además, se observó una mayor inhibición de *F. solani* con los polifenoles obtenidos con la relación m/v 1:16 sin importar si se obtuvo con etanol o agua. En este sentido, el grupo de compuestos polifenólicos CA promovió la mayor inhibición (43.7%) del crecimiento micelial de *F. solani*, dicho grupo de polifenoles fue obtenido por la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, este efecto fue seguido por los grupos de compuestos polifenólicos CB y CD, con 36 y 27% de inhibición, respectivamente. Los grupos de polifenoles CE y CC, causaron un porcentaje de inhibición inferior al testigo positivo (Tecto-60®), 23% y 21 %, respectivamente. Aunque, los polifenoles de guanábana mostraron un efecto inhibitorio contra *F. solani* superior al testigo positivo (Tecto-60®), no se inhibió más del 50% el crecimiento de este hongo a la concentración de 8000 ppm, por lo que su potencial fungicida podría determinarse a

*Fusarium solani*, so the results obtained in the present study cannot be compared.

Against *Alternaria alternata*, the five groups of polyphenols obtained from Tarbush (*F. cernua*) and Soursop (*A. muricata*) were evaluated. The analysis of variance showed significant differences between these groups of polyphenols and the negative control (Figure 3a and 3b). The groups of polyphenols obtained from Tarbush and soursop inhibited between 51 and 58% of the mycelial growth of *A. alternata*, in contrast to the negative control. The results of this assay were lower than those reported by Guerrero et al. (2007), who mentioned that extracts from tarbush leaves inhibited 81.6-82.0% of the mycelial growth of *A. alternata*. However, these authors used solvents such as methanol: chloroform (1:1) and hexane, respectively, the latter being polar and alkaline in

mayores concentraciones (Figura 2c). No fue posible encontrar reportes acerca de las propiedades antifúngicas de polifenoles obtenidos de guanábana contra *Fusarium solani*, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo no se pueden comparar.

Para *Alternaria alternata* se aplicaron los cinco grupos de polifenoles obtenidos de hojásén (*F. cernua*) y de guanábana (*A. muricata*). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre estos grupos de polifenoles vs el testigo negativo (Figura 3 a y 3b). Es decir, los grupos de polifenoles obtenidos a partir de hojásén y de guanábana, afectaron el crecimiento micelial con valores entre 51 y 58% de inhibición, en contraste al testigo negativo. Los resultados de este ensayo fueron inferiores a los reportados por Guerrero et al. (2007), quienes mencionaron que los extractos de hojásén causaron un 81.6-82.0% de inhibición del crecimiento



**Figure 3.** Mycelial inhibition against *Alternaria alternata* by 5 groups of polyphenolic compounds obtained by ultrasound-microwave from a) Tarbush (*Flourensia cernua*) and b) Soursop at 8000 ppm. Groups of polyphenols CA obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%; polyphenols CB obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-0%; polyphenols CC obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-0%, polyphenols CD obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%; polyphenols CE obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%. Columns with the same letter within the same graph are not different according to Tukey's multiple range test.

**Figura 3.** Inhibición micelial de *Alternaria alternata* por 5 grupos de compuestos polifenólicos a 8000 ppm de a) hojásén (*Flourensia cernua*) y b) guanábana obtenidos por ultrasonido-microondas. Grupos de polifenoles CA obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, CB obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-0%, CC obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-0%, CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70%, CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%. Columnas con la misma letra dentro de la misma gráfica, no son diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

nature, characteristics that make it a very efficient solvent but also highly flammable, harmful to the environment and damaging to the health of those who breathe or are in direct contact with it (Pan *et al.*, 2017). The same occurs with chloroform, whose C-Cl bond is useful for the polarization and synthesis of organic molecules, and with methanol, which has the ability to remove water from solutions, during synthesis or separation processes (Sridhar *et al.*, 2011; Ashurst and Nappe, 2022). These three compounds are outstanding alternatives for extraction, but their harmful effects on human health and the environment are much greater than those of ethanol and water, which are used in the present study. The latter are cheap, efficient in the extraction of compounds and do not pose a threat to human or the environment. Moreover, ethanol can be produced by fermentation, and is highly volatile (Baümler *et al.*, 2016). Guerrero *et al.* (2007) reported an inhibition percentage of 80.3% at 2000 ppm using ethanol as extraction solvent. The differences between these results and those obtained in the present study can be explained by the method used to obtain the extracts, the number of molecules with fungicidal activity, the affinity of the polyphenols with the solvent used, the polarity and type of solvent used, the temperature of the extraction process, and the forms of recovery (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

All the polyphenolic groups of soursop (*A. muricata*) obtained by ultrasound-microwave showed an inhibitory effect between 55 and 61% against the mycelial growth of *A. alternata*, compared to the negative control (Figure 3b). To date, no reports have been found about the antifungal properties of polyphenols obtained from soursop against *A. alternata*. The *in vitro* fungal inhibition values observed in the present study are promising (Vitola and Pérez, 2016).

In general terms, it can be said that the simultaneous use of ultrasound and microwave

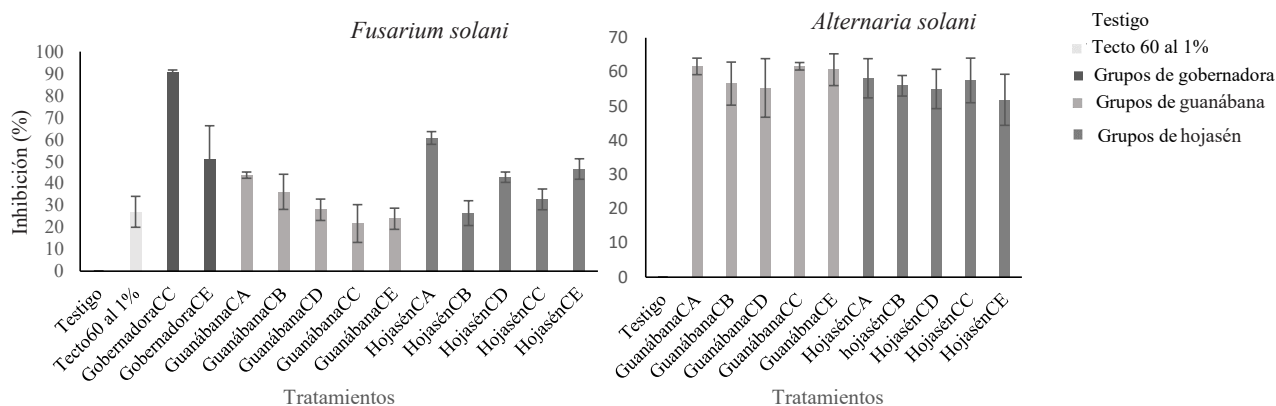
micelial de *A. alternata*, sin embargo, estos autores utilizaron solventes como metanol: cloroformo (1:1) y hexano, respectivamente, este último siendo de naturaleza polar y alcalina, características que lo convierten en un solvente muy eficiente, sin embargo también es altamente inflamable, dañino para el ambiente y tiene efectos sobre la salud de quien respire o esté en contacto directo con este compuesto (Pan *et al.*, 2017), esto mismo ocurre con el cloroformo, siendo útil su enlace C-Cl para la polarización y síntesis de moléculas orgánicas y con el metanol, gracias a su capacidad de remover agua de las soluciones en síntesis o en procesos de separación (Sridhar *et al.*, 2011; Ashurst y Nappe, 2022), siendo los tres compuestos, opciones destacables para la extracción, sin embargo sus inconvenientes a la salud y el ambiente no son comparables con las del etanol y agua, usados en este trabajo, debido a que son baratos, son eficientes en la extracción de compuestos, no representa un daño a las personas o al ambiente, además, el etanol puede ser producido por fermentación, y es altamente volátil (Baümler *et al.*, 2016). Guerrero *et al.* (2007), también reportan una inhibición de 80.3% a 2,000 ppm, utilizando etanol como disolvente de extracción. Las diferencias de estos resultados con los obtenidos en el presente estudio, pueden ser explicadas por la metodología de obtención de los extractos, cantidad de moléculas con actividad fungicida, afinidad de los polifenoles con el disolvente empleado, polaridad y tipo de disolvente empleado, temperatura en el proceso de obtención, y formas de recuperación (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

Con todos los grupos polifenólicos de guanábana (*A. muricata*) obtenidos mediante ultrasonido-microondas se apreció una inhibición (entre 55 y 61%) del crecimiento micelial de *A. alternata* en comparación al testigo negativo (Figura 3b). A la fecha, no se encontraron reportes acerca de las propiedades antifúngicas de polifenoles obtenidos de guanábana contra *A. alternata*. Los valores de

was an efficient extraction method to obtain compounds with antifungal properties, at least against the pathogens *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*. The inhibition percentage of these compounds against the mycelial growth of both pathogenic fungi exceeded 50% at 8000 ppm, compared to the negative control. Sixteen percent of the groups of polyphenols evaluated had an inhibitory effect greater than or equal to 50% against *F. solani*, while 90.9% of the groups of polyphenols had an inhibitory effect greater than or equal to 50% against *A. alternata* (Figure 4). This means that, at 8000 ppm, only 3 groups of polyphenols (CD, CE and CA) have polyphenolic compounds with mycelial inhibition capacity (between 50-90%) against *F. solani*, these being those obtained from *L. tridentata* and *F. cernua* with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70% as solvent (CD) and 1:12/EtOH-30% (CE) for the first plant species, and 1:16/

inhibición fúngica *in vitro* observados en este estudio son prometedores (Vitola y Pérez, 2016).

En términos generales, se puede mencionar que la metodología de extracción empleando simultáneamente ultrasonido-microondas es eficiente para obtener compuestos con propiedades antifúngicas al menos para los patógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium solani*, ya que la inhibición del crecimiento micelial a 8000 ppm superó el 50% en ambos fitopatógenos en contraste al testigo negativo, en este caso, el 16% de los grupos de polifenoles evaluados presentaron una tasa de inhibición superior o igual a 50% en *F. solani*, y un 90.9% de los grupos de polifenoles presentaron una tasa de inhibición superior o igual a 50% en *A. alternata* (Figura 4). Lo anterior, significa que solo 3 grupos de polifenoles (CD, CE y CA) a 8000 ppm tienen compuestos polifenólicos con capacidad de inhibición micelial (entre 50-90%) en *F. solani*, siendo estos



**Figure 4.** Antifungal activity of various groups of polyphenolic compounds (at 8000 ppm) obtained with different m/v ratios and proportions of ethanol against *Fusarium solani* and *Alternaria alternata*. Group of polyphenols CA obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%; polyphenols CB obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-0%; CC polyphenols obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-0%; polyphenols CD obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%, polyphenols CE obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%.

**Figura 4.** Actividad antifúngica de diversos grupos de compuestos polifenólicos a 8000 ppm obtenidos con diferentes relaciones m/v y porcentaje de etanol contra *Fusarium solani* y *Alternaria alternata*. Grupos de polifenoles CA obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, CB obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-0%, CC obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-0%, CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70%, CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%.



EtOH-70% (CA) for the latter one. In the three groups of polyphenols (CA, CD, and CE), ethanol was used as solvent at 70, 70 and 30% respectively. The differences in fungal inhibition might be associated with the amount of plant material used. In the case of the Creosote bush, the most efficient polyphenolic groups were those where ethanol was used at a higher concentration (70%) together with the largest amount of plant biomass (125 g L<sup>-1</sup>). In the case of Tarbush, the inhibitory efficiency was inversely proportional to the plant biomass used; the lower the biomass (62.5 g L<sup>-1</sup>), the higher the inhibitory effect (Figure 2). The mycelial growth of *A. alternata* was inhibited by all the groups of polyphenols evaluated, regardless of the m/v ratio and the type of solvent (Figure 4).

The different m/v ratios and solvent concentrations used in the extraction allowed obtaining different amounts of total polyphenols (condensed and water-soluble), expressed in mg per gram of plant material. Figure 5 shows that

los obtenidos de *L. tridentata* y *F. cernua* con la relación m/v y disolvente de 1:8 / EtOH-70% (CD) y 1:12 / EtOH-30% (CE) para la primera especie vegetal, y 1:16 / EtOH-70% (CA) para la segunda. Se puede observar que en los tres grupos de polifenoles (CA, CD, y CE) fue usado el etanol como disolvente en 70, 70 y 30 %, respectivamente, sin embargo, las diferencias en la inhibición fúngica pudieran estar asociadas a la cantidad de material vegetal utilizado, ya que en el caso de la gobernadora, los grupos polifenolicos más eficientes fueron aquellos donde se usó el etanol a mayor concentración (70%), y la mayor cantidad de biomasa vegetal (125 g L<sup>-1</sup>), y respecto a hojásén, se observó que la mayor eficiencia ocurre inversamente a la biomasa vegetal utilizada, menor biomasa (62.5 g L<sup>-1</sup>), mayor efecto inhibitorio (Figura 2). Por otro lado, también se observa que el crecimiento micelial de *A. alternata* es inhibido por todos los grupos de polifenoles evaluados, sin importar la relación m/v y el tipo de disolvente (Figura 4).

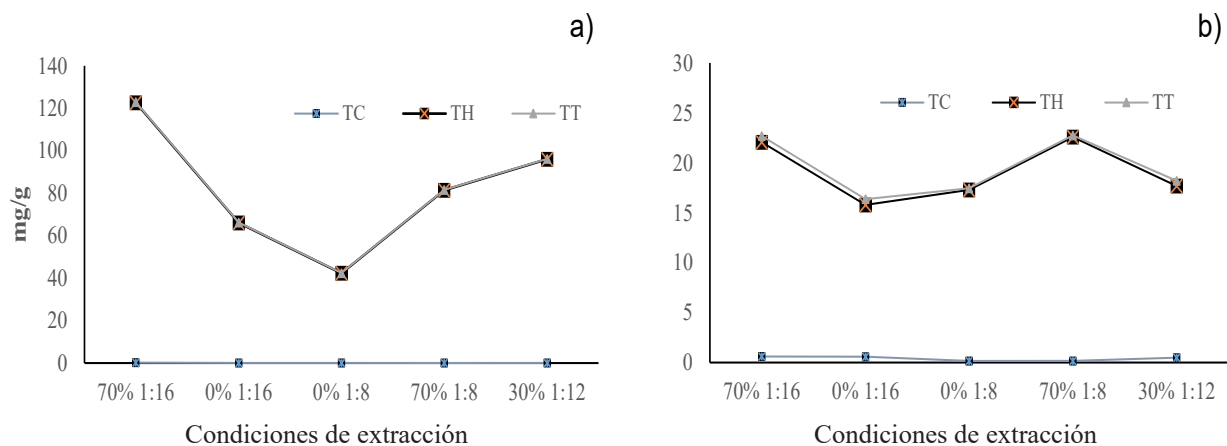


Figure 5. Concentration of total polyphenols (condensed and water-soluble) obtained with different m/v ratios and ethanol proportions; a) Creosote bush polyphenols, b) Tarbush polyphenols.

Figura 5. Concentración de polifenoles totales (condensados e hidrosolubles) obtenidos con las diferentes relaciones m/v y porcentaje de etanol; a) Polifenoles de gobernadora, b) Polifenoles de hojásén.

a m/v ratio of 1:16 and EtOH-70% (CA) made it possible to recover the highest proportion of both types of polyphenols in both plant species. However, the groups of Creosote bush polyphenols that had the greatest inhibitory effect against the mycelial growth of *F. solani* were those obtained with 1:8/EtOH-70% (CD) and 1:12/EtOH -30% (CE). When Tarbush was used, the greatest inhibitory effect coincided with one of the groups that had the highest amount of polyphenols (CA). All the polyphenol groups had a similar inhibitory effect against the mycelial growth of *A. alternata*. Therefore, the m/v ratio and the solvent proportion did not affect the mycelial inhibition percentage.

The inhibitory activity against mycelial growth may be caused by the polyphenolic compounds present in each group rather than by the amount of hydrolysable or condensed polyphenols. The differences in the profile of polyphenolic compounds of each group (Tables 2 and 3) are given by the m/v ratio, the affinity of polyphenols for the solvent used, the polarity and type of solvent used, the temperature during the production process, and the forms of recovery (Gómez-Martínez *et al.*, 2020). A greater number of polyphenolic compounds was observed in the group of CD polyphenols than in the CE group obtained from Creosote bush. Some compounds found in the CD group, such as epirosmanol, have been reported to have an antimicrobial or antioxidant effect. Epirosmanol results from the oxidation of carnosic acid and has a high antioxidant capacity. The CD group also has molecules with not only highly antioxidant activity but also antimicrobial activity such as rosmadiol (Quintana *et al.*, 2019; Ávila *et al.*, 2011). The CD polyphenol group includes apigenin, a compound that has been described as one of the most abundant flavonoids. There is a positive relationship between the consumption of this flavonoid and a decrease in mortality due to stomach cancer. It also has

Las diferentes relaciones m/v y concentraciones de los disolventes empleados en la extracción permitieron obtener cantidad diferentes de polifenoles totales (condensados e hidrosolubles) en mg por gramo de material vegetal. En la Figura 5 se observa que con la relación m/v 1:16 /EtOH-70% (CA) se logró recuperar la mayor proporción de ambos tipos de polifenoles, en ambas especies vegetales. Sin embargo, los grupos de polifenoles de gobernadora que tuvieron el más alto grado de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* fueron aquellos obtenidos con las relaciones m/v 1:8/EtOH-70% (CD) y 1:12/ EtOH-30% (CE). Mientras que cuando se usó hojásén, la más alta inhibición coincide con uno de los grupos que presento mayor cantidad de polifenoles (CA). Por otro lado, todos los grupos de polifenoles mostraron similar nivel de inhibición en el crecimiento micelial de *A. alternata*, por lo tanto, no importo la relación m/v y disolvente en el grado de inhibición micelial.

La actividad inhibitoria del crecimiento micelial pude estar dada más por los compuestos polifenólicos presentes en cada grupo que por las cantidades de polifenoles hidrolizables o condensados, la diferencia en el perfil de compuestos polifenólicos encontrados en cada grupo (Cuadros 2 y 3) están dados por la relación m/v, afinidad de los polifenoles con el disolvente empleado, polaridad y tipo de disolvente empleado, temperatura en el proceso de obtención, y formas de recuperación (Gómez-Martínez *et al.*, 2020). En el grupo de polifenoles CD obtenido de gobernadora se observaron mayor número de compuestos polifenólicos, que en el grupo CE; algunos compuestos que están en el grupo CD se han reportado que tienen efecto antimicrobiano o antioxidante como el epirosmanol, el cual es el resultado de la oxidación del ácido carnósico y que posee una alta capacidad antioxidante, además de la detección de moléculas con actividades no solo altamente antioxidantes sino

**Table 2. Compounds identified in Creosote bush powders according to the mass volume ratio.**  
**Cuadro 2. Compuestos identificados según la relación de masa volumen para polvos de Gobernadora.**

| T.R<br>(min) | Masa<br>(m/z) | Compuestos                                         |                                                    | Familia                            |
|--------------|---------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------|
|              |               | Grupo CD (70% 1:8)                                 | Grupo CE (30% 1:12)                                |                                    |
| 39.23        | 346.9         |                                                    | 5- heptadecil resorcinol                           | Alquiflenoles                      |
| 34.09        | 504.8         | Peonidin 3-O-(6-acetil-glucósido)                  |                                                    | Antocianinas                       |
| 27.6         | 288.8         | Catequina                                          |                                                    | Catequina                          |
| 33.42        | 304.9         |                                                    | Epigallocatequina                                  | Catequina                          |
| 22.61        | 304.8         | <b>Galocatequina</b>                               |                                                    | Catequina                          |
| 25.7         | 304.9         |                                                    | <b>(+) Galocatequina</b>                           | Catequinas                         |
| 35.08        | 302.8         | Taxifolina o dihidroquercetina                     |                                                    | Dihidroflavonol                    |
| 44.21        | 268.8         | Apigenina                                          |                                                    | Flavones                           |
| 30.45        | 592.9         |                                                    | Apigenina 6,8- di glucósido                        | Flavones                           |
| 27.97        | 592.8         | Luteolin 7- rutinoside                             |                                                    | Flavones                           |
| 22.64        | 284.9         |                                                    | Luteolina                                          | Flavones                           |
| 24.2         | 284.9         |                                                    | Scutellarina                                       | Flavones                           |
| 34.37        | <b>608.9</b>  |                                                    | <b>Quercetina 3-O glucósido<br/>7-O rhamnoside</b> | Flavonoles                         |
| 32.05        | <b>608.8</b>  | <b>Quercetina 3-O-glucósido<br/>7-O-rhamnoside</b> |                                                    | Flavonoles                         |
| 35.82        | 770.7         | Quercetina 3-O-glucosyl-<br>ramnosil-galactósido   |                                                    | Flavonoles                         |
| 32.28        | <b>754.9</b>  |                                                    | <b>Quercetina 3-O-ramnosil glucósido</b>           | Flavonoles                         |
| 30.17        | <b>754.8</b>  | <b>Quercetina 3-O-ramnosil-<br/>glucósido</b>      |                                                    | Flavonoles                         |
| 49.52        | 300.9         | <b>NDGA</b>                                        |                                                    | Lignanosis                         |
| 51.69        | 301           |                                                    | <b>NDGA</b>                                        | Lignanosis                         |
| 28.05        | 542.8         |                                                    | Ácido 3,4- feruloiquinico                          | Ácido metoxicinámico               |
| 48.16        | <b>298.9</b>  | <b>Hispidulina</b>                                 |                                                    | Methoxiflavones                    |
| 48.46        | <b>298.9</b>  |                                                    | <b>Hispidulina</b>                                 | Methoxiflavones                    |
| 40.95        | <b>314.8</b>  | <b>Nepetin</b>                                     |                                                    | Methoxiflavones                    |
| 43.03        | <b>314.8</b>  |                                                    | <b>Nepetin</b>                                     | Methoxiflavones                    |
| 29.46        | 370.8         | Sinensetina                                        |                                                    | Methoxiflavones                    |
| 27.59        | <b>328.9</b>  |                                                    | <b>3,7- Dimetil quercetina</b>                     | Methoxiflavones                    |
| 44.96        | <b>328.8</b>  | <b>3,7- Dimetil quercetina</b>                     |                                                    | Methoxiflavones                    |
| 52.48        | 283           |                                                    | <b>Metil galadin</b>                               | Methoxiflavones                    |
| 50.31        | 282.9         | <b>Metil galadin</b>                               |                                                    | Methoxiflavones                    |
| 38.28        | <b>330.8</b>  | <b>Ácido carnósico</b>                             |                                                    | Diterpeno fenólico                 |
| 40.39        | <b>330.8</b>  |                                                    | <b>Ácido carnósico</b>                             | Diterpeno fenólico                 |
| 42.39        | 344.7         | Epirosmanol                                        |                                                    | Diterpeno fenólico                 |
| 41.58        | 344.8         | Rosmadial                                          |                                                    | Diterpeno fenólico                 |
| 28.74        | 862.7         | Procianidina C1                                    |                                                    | Trímeros de<br>protoantocianidinas |

En negritas compuestos similares encontrados en cada grupo obtenido con unas condiciones de extracción diferente. / In bold, similar compounds found in each group obtained with different extraction conditions.

**Table 3. Compounds identified according to the mass-volume ratio for powdered senna.**  
**Cuadro 3. Compuestos identificados según la relación de masa volumen para polvos de hojásén.**

| T.R<br>(min) | MASA<br>(m/z) | Compuestos                              |                                         | FAMILIA               |
|--------------|---------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
|              |               | Grupo CA (70% 1:16)                     | Grupo CB (0% 1:16)                      |                       |
|              | 242.8         |                                         | Dihidroquercetina                       | Dihidroflavonoles     |
| 44.19        | 268.7         | Apigenina                               |                                         | Flavones              |
| 28.19        | <b>592.8</b>  |                                         | <b>Apigenina 6,8 glucósido</b>          | Flavones              |
| 28.06        | <b>592.8</b>  | <b>Apigenina 6,8 glucósido</b>          |                                         | Flavones              |
| 29.9         | <b>562.8</b>  | <b>Apigenina glucósido- arabinósido</b> |                                         | Flavones              |
| 29.92        | <b>562.8</b>  |                                         | <b>Apigenina glucósido- arabinósido</b> | Flavones              |
| 40.66        | 676.7         | Metoxiflavona                           |                                         | Flavones              |
| 44.97        | 298.7         | Quercetina                              |                                         | Flavonol              |
| 34.74        | <b>514.7</b>  | <b>Ácido 1,3- dicafeoilquinico</b>      |                                         | Ácido hidroxicinámico |
| 35.79        | <b>514.7</b>  |                                         | <b>Ácido 1,3- dicafeoilquinico</b>      | Ácido hidroxicinámico |
| 18.51        | <b>352.8</b>  | <b>Ácido 1-cafeoilquinico</b>           |                                         | Ácido hidroxicinámico |
| 24.16        | <b>352.8</b>  |                                         | <b>Ácido 1-cafeoilquinico</b>           | Ácido hidroxicinámico |
| 24.66        | <b>352.7</b>  | <b>Ácido 3-cafeoilquinico</b>           |                                         | Ácido hidroxicinámico |
| 25           | <b>352.8</b>  |                                         | <b>Ácido 3- cafeoilquinico</b>          | Ácido hidroxicinámico |
| 47.11        | 358.7         | Ácido rosmarínico                       |                                         | Ácido hidroxicinámico |
| 26.88        | <b>310.8</b>  | <b>Cafeoil ácido tartárico</b>          |                                         | Ácido hidroxicinámico |
| 26.56        | <b>310.8</b>  |                                         | <b>Cafeoil ácido tartárico</b>          | Ácido hidroxicinámico |
| 35.74        | 514.7         | Ácido 1,5- dicafeoilquinico             |                                         | Ácido hidroxicinámico |
| 39.59        | 312.7         | Cirsimaritina                           |                                         | Methoxiflavona        |
| 45.72        | 314.7         | Nepetin                                 |                                         | Methoxiflavona        |
| 32.01        | <b>370.9</b>  | <b>Tangeretina</b>                      |                                         | Methoxiflavona        |
| 31.8         | <b>370.9</b>  |                                         | <b>Tangeretina</b>                      | Methoxiflavona        |
| 42.59        | 344.7         | Rosmanol                                |                                         | terpenos fenólicos    |

En negritas compuestos similares encontrados en cada grupo obtenido con diferentes condiciones de extracción. / In bold, similar compounds found in each group obtained with different extraction conditions.

antiviral and antibacterial activity (Álvarez and Orallo, 2003). Catechins have a high antioxidant potential, with the ability to cross-link many proteins, which gives them antimicrobial activity, possibly by damaging microbial cytoplasmic lipids and proteins (Rahardiyan, 2019). The antifungal activity of catechin against phytopathogenic fungi has been mentioned in other studies (Istúriz *et al.*, 2019). It has also been reported that procyanidin C1 can inhibit microbial growth through the inhibition of extracellular enzymes, deprivation of essential microbial substrates, disintegration of the

que también antimicrobianas como el rosmadiol (Quintana *et al.*, 2019; Ávila *et al.*, 2011). También en el grupo de polifenoles CD se encontró apigenina, un compuesto el cual ha sido descrito como uno de los flavonoides más abundantes que poseen una relación positiva entre su consumo y la baja en la mortalidad debido al cáncer de estómago y a que tiene además una actividad antiviral y antibacterial (Álvarez y Orallo, 2003), mientras que, catequina presentan un alto potencial antioxidante y tiene capacidad de entrecruzarse con muchas proteínas, lo que le confiere actividad antimicrobiana,

bacterial outer membrane and negatively affecting microbial metabolism (Dasiman *et al.*, 2022). The CA and CB polyphenol groups obtained from Tarbush were compared. In addition to containing apigenin, the CA group also has rosmarinic acid, which can destroy bacterial cells and proteins and inhibit the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATP-ase in cells (Zhang *et al.*, 2021). The CA group of polyphenols also contains nepetin, which can decrease the virulence of various pathogens by binding to caseinolytic protein peptidase P (ClpP) and to Ser-22 and Gln-47 amino acids of the CLpP protein. (Shisong *et al.*, 2022). Another CA compound is quercetin, a flavonoid approved by the FDA with antimicrobial capabilities. It damages cell membranes, modifies membrane permeability, inhibits both nucleic acid and protein synthesis, reduces the expression of virulence factors, induces mitochondrial dysfunction, and prevents biofilm formation (Nguyen *et al.*, 2022). The activity of quercetin against phytopathogenic fungi such as *Penicillium expansum* has been reported elsewhere (Sanzani *et al.*, 2009). The antifungal activity of polyphenolic compounds has been of interest due to their low toxicity and ephemeral persistence in the environment, proving useful applications for organic agriculture (López *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONS

In the present study, it was possible to extract rapidly (20 minutes) polyphenolic compounds from Creosote bush, Tarbush and soursop leaves by simultaneously using environmentally friendly methods (ultrasound-microwave) and solvents (water and ethanol). Different polyphenolic

posiblemente dañando los lípidos y proteínas citoplasmáticos microbianos (Rahardiyan, 2019). Además, se ha mencionado la actividad antifúngica de la catequina contra hongos fitopatógenos (Istúriz *et al.*, 2019). Por otra parte, se ha reportado que procianidina C1 tiene capacidad de inhibir el crecimiento microbiano a través de la inhibición de enzimas extracelulares, privación de sustratos microbianos esenciales, desintegración de la membrana externa bacteriana y afectar negativamente el metabolismo microbiano (Dasiman *et al.*, 2022). En la comparación de los grupos de polifenoles CA y CB obtenidos de hojaseén, el grupo CA además de contener apigenina también cuenta con ácido rosmarínico el cual tiene capacidad de destruir células y proteínas bacterianas e inhibir la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATP-asa en las células (Zhang *et al.*, 2021). El grupo de polifenoles CA también contiene nepetin, el cual puede disminuir la virulencia de diversos patógenos al unirse a la proteína caseinolítica peptidasa P (ClpP), mediante la unión de este polifenol a los aminoácidos Ser-22 y Gln-47 de la proteína CLpP (Shisong *et al.*, 2022) y quercetina, el cual es un flavonoide aprobado por la FDA con que cuenta con capacidades antimicrobianas al dañar la membrana celular, modificar la permeabilidad de la membrana, inhibir tanto síntesis de ácidos nucleicos como de proteínas, reducir la expresión de factores de virulencia, inducir disfunción mitocondrial y prevenir la formación de biopelículas (Nguyen *et al.*, 2022). Se ha reportado la actividad de la quercetina contra hongos fitopatógenos como *Penicillium expansum* (Sanzani *et al.*, 2009). La actividad antifúngica de compuestos polifenólicos ha sido de interés gracias a su baja toxicidad y efímera persistencia en el ambiente, siendo de utilidad en la agricultura orgánica (López *et al.*, 2019).

compounds were extracted, depending on the plant material, the m/v ratio, the solvent and its concentration. The group of polyphenols CD extracted from Creosote bush showed levels of mycelial growth inhibition of *F. solani* of 90%. The mycelial growth of *Alternaria alternata* was inhibited by 50-60% by the groups of polyphenols obtained from tarbush and soursop leaves. In the group profile of CD polyphenols obtained from Creosote bush, various polyphenolic compounds reported to have antioxidant and antimicrobial activity were found, among which the following stand out: epirosmanol, rosmadiol, Apigenin, catechin, and procyanidin C1.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Secretary of Agriculture, Fisheries and Livestock - Mexico, through the project: FON. SEC. SAGARPA-CONACYT CV-2015-4-266936.

#### CITED LITERATURE

- Abbas MF, Rafiq M, Al-Sadi AM, Alfarraj S and Alharbi SA. 2021. Molecular characterization of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on buttonwood (*Conocarpus erectus* L.) and determination of pathogenicity by a novel disease rating scale. PLoS ONE 16 (5): e0251471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251471>
- Abdel MF, Abo EK, and Morsy KM. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop Protection 30(2): 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>
- Álvarez CE y Orallo CF. 2003. Actividad biológica de los flavonoids (I). 2003. Acción frente al cancer. Offarm 22(10): 130-140. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13054406>
- Andrade AG, Delgado AA, Herrera CB, Arévalo GLL y Caso BL. 2018. Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. Agrociencia 52(1): 55-66. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952018000100055&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000100055&lng=es&tlng=es)
- Apolonio RI, Franco MO, Salgado SM and Aquino MJ. 2017. *In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grape vine (*Vitis* spp.) leaves. Mexican Journal of Phytopathology 35(2): 170-185. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-1>

#### CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró extraer compuestos polifenólicos a partir de hojas de gobernadora, hojásen y guanábana, en muy corto tiempo (20 minutos) utilizando simultáneamente métodos (ultrasonido-microondas) y disolventes (agua y etanol) amigables con el medio ambiente. Dependiendo del material vegetal, la relación m/v, el disolvente y su concentración se lograron extraer diferentes compuestos polifenólicos. El grupo de polifenoles CD extraído de gobernadora mostro niveles de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* de 90%. Mientras que el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* fue inhibido en un 50-60% por los grupos de polifenoles obtenidos de hojásen y guanábana. En el perfil de grupo de polifenoles CD obtenido de gobernadora se encontraron diversos compuestos polifenólicos reportados por tener actividad antioxidante y antimicrobiana entre los que destacan: epirosmanol, rosmadiol Apigenina, catequina, procianidina C1.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Secretaria de Agricultura, Pesca y Ganadería - México, a través del proyecto: FON. SEC. SAGARPA-CONACYT CV-2015-4-266936.

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

- Ashurst JV and Nappe TM. 2022. Methanol Toxicity. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482121/>
- Ávila SR, Navarro CAR, Aguilar AP, Vera LO y Dávila MRM. 2011. Romero: una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar 15(43): 23-36. http://cienciaymar.mx/Revista/index.php/cienciaymar/issue/view/22/ART43_2
- Bäumler ER, Carrín ME and Carelli AA. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. Journal of Food Engineering 178: 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.020>

- Berlanga PAM, Gallegos MG, Cepeda SM, Rodríguez HR, Aguilar CN, Castillo RF and Hernández CFD. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6(3): 410-417. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.410.417>.
- Bocker R and Silva EK. 2022. Innovative technologies for manufacturing plant-based non-dairy alternative milk and their impact on nutritional. Sensory and Safety Aspects 5: 100098. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100098>
- Castrillo M, Bich G, Sioli G, Zapata P and Villalba L. 2021. Biocontrol capacity of native isolates of *Trichoderma* sp. against the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* isolated from yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 37(3): 244-256. <https://dx.doi.org/10.29393/chjaas37-26cbml50026>
- Chemat F, Rombaut N, Anne-Gaëlle S, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS and Abert-Vian M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry 34: 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.jultsonch.2016.06.035>
- Chemat F, Abert Vian M., Ravi HK., Khadhraoui B, Hilali S, Perino S, and Tixier AF. 2019. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Principles, Applications and Prospects. Molecules 24(16): 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Costa M, Sezgin BZ, Losada BS, Paiva MF, Saso L, and Bravo DC. 2021. Polyphenols as antioxidants for extending food shelf-life and in the prevention of health diseases.: Encapsulation and Interfacial Phenomena. Biomedicines 9(12) 1909. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121909>
- Dasiman R, Nor NM, Eshak Z, Mutalip SSM, Suwandi NR and Bidin H. 2022. A Review of Procyanidin: Updates on current bioactivities and potential health benefits. Biointerfase Research in Applied Chemistry 12(5):5918 – 5940. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.59185940>
- Farag HR, Zeinab AA, Dawlat AS, Mervat ARI and Srour HAM. 2011. Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. Annals of Agricultural Sciences 56(1): 1-7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aos.2011.05.007>
- Gamboa-Alvarado R, Hernández CFD, Guerrero RE, Sánchez AA y Lira SRH. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* DC.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.). Revista Mexicana de Fitopatología 21(1): 13-18. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221102>
- García W, Lezama H y Pumachagua P. 2019. Estudio teórico de la actividad antioxidante de compuestos aromáticos con bases de schiff heterocíclicas sustituidos en posiciones meta y para. Rev Soc Quím Perú 85(2): 242-257. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v85n2/a11v85n2.pdf>
- Gómez-Martínez M, Ascacio-Valdés JA, Flores-Gallegos AC, González-Domínguez J, Gómez-Martínez S, Aguilar CN and Rodríguez-Herrera R. 2020. Location and tissue effects on phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activity of *Moringa oleifera*. Industrial Crops and Products 151: 1124-1139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112439>
- Guerrero RE, Solís GS, Hernández CF, Flores OA, Sandoval LV, y Jasso CD. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc.. Mexican Journal of Phytopathology 25(1): 48-53. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100007&lng=es&tlng=es
- Gutiérrez GE, Ambriz PD, Leyva LN, Castillo LR and Heredia JB. 2016. Bioavailability of dietary phenolic compounds: review. Revista Española de Nutrición Humana y Dietética 20(2): 140-147. <https://dx.doi.org/10.14306/rehyd.20.2.184>
- Istúriz ZMA, Pérez PM, Contreras SS, and Barrera NLL. 2019. Effect of ethanol extract of fig residue (*Ficus carica*) on growth of postharvest fungi. Mexican Journal of Phytopathology 37(1):72-79. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-6>
- Joaquín RAJ, López PCU, Pinedo EJM, Altamirano RSE, Santiago SYO, Aguirre MCL, and Gutiérrez TJ. 2020. Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla (*Barkleyanthus salicifolius* Rob & Brettell). Chilean Journal of Agricultural Research 80(3): 352-360. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000300352>
- Leslie J and Summerell A. 2006. The *Fusarium* Lab Manual. Blackwell Publishing, Ames. 278p. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470278376>
- López MNR, Romero BM, Arce APM and Hernández RJS. 2019. Actividad antifúngica de antioxidantes derivados de cuatro cultivares de *Capsicum* spp. contra hongos fitopatógenos. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 6(18): 487-498. <https://doi.org/10.19136/era.a6n18.2174>
- Mantecón JD. 2015. Fungicidas aplicados al suelo como estrategia de manejo integrado de enfermedades en papa, bajo escenarios de elevada infestación inicial y residual. Revista Latinoamericana de la Papa 19(1): 29-39. <https://doi.org/10.37066/ralap.v19i1.224>
- Martínez MT, Guerrero AB, Pecina QV, Rivas VP, González PE y Angeles NJ. 2020. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11(5): 1135-1147. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2325>
- Martínez PE, Abreu FJ and Cantillo PT. 2021. Incidence of *Alternaria* spp. on cereal, vegetable, fruit and ornamental sedes. Revista de Protección Vegetal 36(1): 2224-4697. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/1123/1754>
- Martínez SG, Rey BJ, Pargas PR y Manzanilla EE. 2020. Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. Agronomía Mesoamericana 31(1): 259-276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>

- Mata SC, Leyva MS, Camacho TM, Tovar PM, Huerta EJ, Villaseñor MH and García LE. 2018. Agresividad de aislados de *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata* en variedades de trigo en México. Mexican Journal of Phytopathology 36(3): 432-443. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1803-3>
- Morales RI, Yañez MM, Silva RH, García DG Guzmán PD. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in México associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. Mycopathologia 163:31-39. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0082-1>.
- Mutha RE, Tatiya AU and Surana SJ. 2021. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. Future Journal of Pharmaceutical Sciences 7(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>
- Nguyen TLA and Bhattacharya D. 2022. Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle. Molecules 27:2494. <https://doi.org/10.3390/molecules27082494>.
- Oufensou S, Balmes V, Azara E, Fabbri D, Dettori MA, Schüller C, Zehetbauer F, Strauss J, Delogu G, and Migheli Q. 2020. Naturally occurring phenols modulate vegetative growth and deoxynivalenol biosynthesis in *Fusarium graminearum*. ACS Omega 5(45): 29407-29415. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04260>
- Pan JH, Peng CY, Lo CT, Dai CY, Wang CL and Chuang HY. 2017. n-Hexane intoxication in a Chinese medicine pharmaceutical plant: a case report. Journal of Medical Case Reports 11: 120. <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1280-9>
- Peñuelas RO, Arellano GM, Verdugo FAA, Chaparro- ELA, Hernández RSE, Martínez CJL y Vargas AIC. 2017. Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radices-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero. Mexican Journal of Phytopathology 35(3): 360-376. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-3>
- Pérez RL, Pérez ML, Guzmán MR, Sanzón GD y Belmonte VJ. 2019. Sensibilidad *in vitro* de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. Acta universitaria 29: 1-11. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2339>
- Quintana SE, Villanueva BD, Reglero G, García RMR and Fornari T. 2019. Supercritical antisolvent particle precipitation and fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Journal of CO2 Utilization 34: 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.032>
- Rahardiyani D. 2019. Antibacterial potential of catechin of tea (*Camellia sinensis*) and its applications. Food Research 3 (1): 1 – 6. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(1\).097](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(1).097)
- Reyes TA, Rodríguez AG, Santillán MR, Díaz CM y Fernández PS. 2019. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. Mexican Journal of Phytopathology 37 (No. Esp. 1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-1>
- Rodríguez CA, Torres HS, Domínguez CA, Romero GA and Silva FM. 2020. Plant extracts to control *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*: a sustainable alternative for agriculture. Abanico Agroforestal 2:1-13. <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-agroforestal/article/view/265>
- Sanzani SM, De Girolamo A, Schena L, Solfrizzo M, Ippolito A and Visconti A. 2009. Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone European Food Research and Technology 228: 381-389. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0944-5>
- Sepúlveda-Rincón CT, Ciro-Gómez GL y Zapata-Montoya JE. 2016. Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 21(2):133-144. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v21n2/pla02216.pdf>
- Shisong J, Xinran R, Li W, Xiangri K, Xingye W, Xiren C, Xuerui G, Yan S, Jiyu G, Tiedong W, Bingmei W, Wu S and Yicheng Z. 2022. Nepetin reduces virulence factors expression by targeting ClpP against MRSA-induced pneumonia infection. Virulence 13(1):578-588, <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2022.2051313>
- Simmons EG. 2007. *Alternaria*: an identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp. <https://www.nhbs.com/alternaria-an-identification-manual-book>.
- Singh R and Chandrawat KS. 2017. Role of phytoalexins in plant disease resistance. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(1): 125-129. <http://dx.doi.org/10.20546/ijemas.2017.601.016>
- Soto GM y Rosales CM. 2016. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. Maderas. Ciencia y Tecnología 18(4): 701-714. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Sridhar N, Krishnakishore C, Sandeep Y, Sriramaveen P, Manjusha Y and Sivakumar V. 2011. Chloroform Poisoning – A Case Report. Renal Failure 33(10): 1037-1039. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2011.618920>
- Takshak S and Agrawal SB. 2019. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 193: 51-88. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>
- Valdez GD, Esparza GS, Morlett CJ, Nery FS, Flores GA, Ascacio VJ and Rodríguez-Herrera R. 2021. Isolation of polyphenols from soursop (*Annona muricata* L.) leaves using green chemistry techniques and their anticancer effect. Biological and Applied Sciences 64: e21200163. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200163>
- Vitola RD and Pérez CA. 2016. Bioactivity from *Annona muricata* extracts and essential oils from *Citrus aurantium* against *Phytophthora cinnamomi*. Revista Colombiana de Ciencia Animal 8(s): 325-334. <https://doi.org/10.24188/recia.v8.n0.2016.388>
- Zhang Y, Cai P, Cheng G and Zhang Y. 2022. A brief review of phenolic compounds identified from plants: Their extraction, analysis, and biological activity. Natural Product Communications 17(1): 1-14. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>

Zhang J, Cui X, Zhang M, Bai B, Yang Y and Fan S. 2021.
The antibacterial mechanism of perilla rosmarinic
acid. *Biotechnology Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/bab.2248>.

Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico

Identificación preliminar y relación filogenética de begomovirus asociados con *Capsicum* spp. en la península de Yucatán, México

Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Josefina I. Maldonado-Borges, Lucila A. Sánchez-Cach, Yereni Minero-García, ¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Mérida, Yucatán, México, C.P. 97205, Cecilia Hernández-Zepeda, Unidad de Ciencias del Agua, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., C.P. 77500; Oscar A. Moreno-Valenzuela^{1*}.

*Corresponding autor: oamv@cicy.mx

Received: June 16, 2022.

Accepted: August 24, 2022.

Gracia-Medrano RME, Maldonado-Borges JI, Sánchez-Cach LA, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C and Moreno-Valenzuela AO. 2022. Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 377-400.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-6>

First DOI publication: August 31, 2022.

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2022.

Abstract. Pepper plants with viral symptoms were collected in the Yucatan Peninsula, Mexico (YPM) with the objective to characterize the partial identity and the genetic and phylogenetic relationship of the begomoviruses infecting different pepper species, including *Capsicum chinense*, various *C. annuum* landraces, *C. frutescens*, *C. a. var. aviculare*, as well

Resumen. Se colectaron plantas de chile con síntomas virales en la Península de Yucatán, México (YPM), con el objetivo de caracterizar la identidad parcial y las relaciones genéticas y filogenéticas de los begomovirus que infectan diferentes especies de chile, que incluyen *Capsicum chinense*, variedades locales de *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. annuum* var. *aviculare*, así como algunas especies de maleza. Las muestras de hoja fueron colectadas durante dos temporadas de infestación severa de mosquita blanca. El ADN genómico de las plantas se extrajo y un fragmento de los begomovirus se amplificó utilizando cebadores universales. Los amplicones fueron secuenciados y utilizados para análisis genéticos y filogenéticos. Los resultados demostraron que el 90.1% de las plantas colectadas (151) estuvieron infectadas por begomovirus. Los datos mostraron que el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) es el virus más frecuente en las plantas cultivadas, semicultivadas y silvestres que se

as some weeds. The leaf samples were collected during two severe whitefly infestation seasons. Total genomic DNA from the sampled plants was extracted and a fragment of the begomoviruses was amplified using universal primers. Amplicons obtained were sequenced and sequences were used for genetic and phylogenetic analysis. Our results demonstrate that 90.1 % of the total sampled plants (151) were infected with begomoviruses. The data identified *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) as the most frequent species found within cultivated, semi-cultivated, and wild-analyzed samples. In addition, sequence analysis indicates the presence of *Euphorbia mosaic virus-Yucatán Peninsula* (EuMV-YP) infecting a Habanero chili plant, as well as the predominance of PepGMV in different weed plant species. Genetic variation based on nucleotide distance analysis from partial DNA-A begomovirus sequences indicated that the PepGMV isolates were closely related among them sharing 95 to 99% nucleotide sequence identity. Data showed that begomovirus that infected the sampled plants included the partially identified species of PepGMV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and EuMV-YP.

Key words: *Capsicum annuum* landraces, habanero chili, phylogeny, weed plants

Members of the family Geminiviridae have circular, single-stranded DNA (ssDNA) genomes encapsidated in twinned icosahedral particles; they form the second-largest family of plant viruses. The genus *Begomoviridae* comprises viruses with monopartite (one ~2.9-kb DNA) and/or mostly bipartite genomes (two ~2.6-kb DNAs, referred as DNA-A and DNA-B) (Brown *et al.*, 1995; Fauquet

analizaron en este trabajo. Además, las secuencias analizadas indicaron la presencia del *Euphorbia mosaic virus-Yucatán Peninsula* (EuMV-YP) en plantas de chile habanero, así como la predominancia del PepGMV en diferentes especies de maleza. La variación genética de las secuencias del fragmento del componente A de los begomovirus, mostró que los aislados del PepGMV analizados están estrechamente relacionados entre ellos y comparan un 95-99% de identidad. Los datos mostraron que los begomovirus que infectan a las plantas colectadas incluyen a las especies parcialmente identificadas como PepGMV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and EuMV-YP.

Palabras clave: razas silvestres de *Capsicum*, chile habanero, filogenia, maleza.

Los miembros de la familia Geminiviridae, que tienen genomas circulares de ADN monocatenario (ssDNA) encapsidados en partículas icosaédricas gemelas, forman la segunda familia más grande de virus de plantas. El género *Begomovirus* comprende virus con genomas monopartitas (un componente de ADN de ~2,9 kb) y/o en su mayoría bipartitas (dos componentes de ADN de ~2,6 kb, denominados ADN-A y ADN-B) (Brown *et al.*, 1995; Fauquet y Stanley, 2005; Jones, 2003). Los *begomovirus* incluyen más de 440 especies, algunas de las cuales pueden infectar plantas dicotiledóneas. Las especies de begomovirus son transmitidas por mosquitas blancas del complejo de especies crípticas *Bemisia tabaci* (Fiallo-Olive *et al.*, 2021). Se han documentado enfermedades devastadoras causadas por begomovirus en diferentes cultivos en América Central, México, la cuenca del Caribe, el sur de los Estados Unidos de América y América del Sur. Las

and Stanley, 2005; Jones, 2003). Begomoviruses includes more than 440 species, members of which infect dicot plants and are transmitted by whiteflies of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex (Fiallo-Olive *et al.*, 2021). In particular, devastating diseases to cultivated plants caused by begomoviruses have been documented through Central America, Mexico, the Caribbean Basin, the Southern United States of America, and South America, yield losses range from 50 to 90% of total production. (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2005; Rausch *et al.*, 2005; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Previous reports have confirmed the incidence of begomoviruses in a range of solanaceous crop plants and native flora from various parts of Mexico (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999; Garrido-Ramirez and Gilbertson, 1998; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c; Torres-Herrera *et al.*, 2019; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). In particular, PepGMV was reported in cultivated and wild pepper, in different regions of Mexico, as Baja California, Sinaloa, Sonora, the Comarca Lagunera, Campeche, Yucatan, San Luis Potosi, Michoacan, among others (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019).

Capsicum annum (family: Solanaceae), a high-value crop for its non-pungent (sweet pepper) and pungent (chili syn. hot pepper) fruits, is the foremost pepper species cultivated worldwide (Bosland and Votova, 2000; Park *et al.*, 2021). This species, together with other pungent, valuable species, originating and domesticated in the tropical Americas—such as *C. chinense* (chili Habanero), *C. pubescens* (chili Manzano), and *C. frutescens* (chili Tabasco or Picopaloma)—are broadly cultivated and consumed in the diet throughout Mexico (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005).

pérdidas oscilan entre el 50 y el 90 % de la producción total (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2005; Rausch *et al.*, 2005; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Reportes previos han confirmado la incidencia de begomovirus en una variedad de plantas cultivadas de la familia Solanácea y flora nativa de varias regiones de México (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999; Garrido-Ramirez y Gilbertson, 1998; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007b; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007c; Torres-Herrera *et al.*, 2019; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). En particular, el PepGMV ha sido reportado en chile cultivado y silvestre en diferentes regiones de México como Baja California, Sinaloa, Sonora, la Comarca Lagunera, Campeche, Yucatán, San Luis Potosí y Michoacán, entre otros lugares (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019).

Capsicum annum (familia: Solanaceae), un cultivo de alto valor debido a sus frutos no picantes (pimiento dulce) y picantes (chile syn. hot pepper), es la especie de chile más cultivada en todo el mundo (Bosland y Votova, 2000; Park *et al.*, 2021). Esta especie, junto con otras especies picantes y valiosas que se originaron y domesticaron en América tropical, como *C. chinense* (chile habanero), *C. pubescens* (chile manzano) y *C. frutescens* (chile tabasco o picopaloma), se cultivan y se consumen ampliamente en México (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005). Los problemas persistentes que afectan a estos cultivos incluyen una variedad de virus y sus vectores. Gran parte de las pérdidas de rendimiento se atribuyen a enfermedades virales causadas por begomovirus y al uso de genotipos de chile susceptibles (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). La diversidad del chile es un recurso esencial para la mejora genética y el manejo del cultivo. En combinación con la maleza, los chiles actúan

Persistent problems affecting these crops include a range of viruses and their vectors. Of these, the viral disease that accounts for much of the yield losses is attributed to begomoviruses and the use of susceptible cultivated pepper genotypes (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Pepper diversity is an essential resource for genetic improvement and crop management; in combination with natural weeds, they are host reservoirs of viruses, which, together with the whitefly-vector, might support pathogen-diversifying events that should be investigated. In the states of the Yucatan Peninsula of Mexico (YPM), variations in *C. annuum* var. *annuum* landraces (such as those the Mayan named Ya'ax iik, X'kat iik, Dulce, and the wild grown *C. annuum* var. *aviculare*, named Maax iik) in response to changing biotic and/or abiotic stresses are significant. These landraces, which are primarily grown in home gardens, the Milpa system (associated with other crops), or harvested *in situ*, are utilized for local consumption and as a source for rural family income (Cazares-Sanchez *et al.*, 2005). Despite their importance, information regarding the distribution and disease incidence by different pathogens, such as begomoviruses, is limited. In addition, the Habanero chili, an essential crop for both local use and export, is cultivated in extensive cropping areas; however, increased use of agrochemicals has not diminished losses on fruit harvest; rather, whitefly infestation and viral diseases exceeded 90% during the dry season (March to May of each year, farmer, and author observations). The severity of these problems has impacted Habanero field cultivation; traditional field production has moved toward alternative cropping systems, such as mulching, tunneling and greenhouses. Thus, as a first step towards the development of broad control strategies, pathogens common to cultivated, wild relatives, and weed species, as well as their vectors, must be recognized

como reservorio hospedero de virus que, junto con la mosquita blanca, contribuyen a la diversificación de patógenos en un proceso que debe investigarse más a fondo. En los estados de la Península de Yucatán en México (YPM), variaciones significativas en las razas nativas de *C. annuum* var. *annuum* (cuyos nombres mayas son Ya'ax iik, X'kat iik, Dulce y el chile silvestre *C. annuum* var. *aviculare*, llamado Maax iik), se producen en respuesta a cambios de estrés biótico y/o abiótico. Estas variedades locales, que se cultivan principalmente en huertos familiares con el sistema de Milpas (asociado a otros cultivos), o se cosechan *in situ*, se utilizan para el consumo local y como fuente de ingresos de las familias rurales (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005). A pesar de su importancia, existe información limitada sobre la distribución e incidencia de diferentes patógenos como los begomovirus. El chile habanero, un cultivo esencial tanto para uso local como para exportación, se cultiva en extensos campos agrícolas. Sin embargo, el mayor uso de agroquímicos no ha reducido las pérdidas de la cosecha. Más bien, la infestación de la mosquita blanca y las enfermedades virales todavía afectan al 90% del cultivo durante la estación seca (marzo a mayo de cada año; observaciones de agricultores locales y del autor). La severidad de estos problemas ha afectado el cultivo de chile habanero en campo. La producción de campo tradicional se ha desplazado hacia sistemas de cultivo alternativos como el acolchado, la agricultura en microtúnel y los invernaderos. El primer paso hacia el desarrollo de estrategias amplias de control es la identificación y caracterización genética de los patógenos (y sus vectores), que son comunes a las especies de chile silvestre y cultivado, así como a las especies de maleza que están asociadas con ellas. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la identidad parcial y las relaciones genéticas y filogenéticas de los begomovirus que infectan diferentes chiles, incluyendo *C.*

and genetically characterized. The objective of this study was to characterize the partial identity, the genetic diversity and the phylogenetic relationship of the begomoviruses infecting different peppers, including the cultivated *C. chinense*, various *C. a. annuum* landraces and *C. frutescens* and the wild grown *C. annuum* var. *aviculare* (Maax iik), as well as some uncultivated plants grown as weeds from different locations in the state of Yucatan and Campeche. Genetic and phylogenetic analyses based on nucleotide sequences of the core Coat Protein gene (*Cp*) region (CPR) were used to explore begomovirus genetic diversity and resolve the possible relationship with other known bipartite begomovirus.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and source of viruses

A total of 151 symptomatic plant samples were collected, including cultivated *Capsicum chinense* Habanero-type (45) and Scotch Bonet-type (12), *C. annuum* var. *annuum* landraces regionally identify as Dulce (18), X'kat iik (12), and Ya'ax iik (8) plants of *C. annuum* var. *aviculare* locally called Maax iik (43), and *C. frutescens* (8) Tabasco-type plants that grow wild or in-home gardens. Additionally, we collected representative weeds from different families: *Callicarpa* spp., (Verbenaceae) (1), *Croton malvaviscifolius* (Euphorbiaceae) (1), *Dicliptera sexangularis* (Acanthaceae) (1), *Herissantia crispa* (Malvaceae) (1), and *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) (1). Plant material was collected in locations within the states of Yucatan (YS) and Campeche (CS) in the YPM (Table 1, Figure 1). The weed leaf samples were gathered from wild grown plants in non-cropping sites and from pepper cultivated areas during a severe whitefly

chinense cultivado, varias variedades locales de *C. a. annuum* y *C. frutescens* y la especie silvestre *C. annuum* var. *aviculare* (Maax iik), así como algunas plantas silvestres que crecen como maleza en diferentes localidades del estado de Yucatán y Campeche. Se utilizaron análisis genéticos y filogenéticos basados en secuencias de nucleótidos de la región central del gen de la proteína de la capsida (*Cp*) (CPR) para explorar la diversidad genética de los begomovirus y determinar la posible relación con otros begomovirus bipartitas conocidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y fuentes de virus

Se utilizaron un total de 151 muestras de plantas de chile con síntomas, incluidas las cultivadas de tipo habanero *Capsicum chinense* (45) y tipo Scotch Bonet (12); las variedades locales de *C. annuum* var. *annuum* identificadas regionalmente como Dulce (18); X'kat iik (12) y Ya'ax iik (8); plantas de *C. annuum* var. *aviculare* conocida localmente como Maax iik (43) y plantas de *C. frutescens* (ocho) tipo Tabasco, que crecen silvestres o en huertos familiares. Adicionalmente, se recolectó maleza representativa de diferentes familias: *Callicarpa* spp., (Verbenaceae) (uno), *Croton malvaviscifolius* (Euphorbiaceae) (uno), *Dicliptera sexangularis* (Acanthaceae) (uno), *Herissantia crispa* (Malvaceae) (uno) y *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) (uno). El material vegetal recolectó en diferentes localidades de los estados de Yucatán (YS) y Campeche (CS), ambos ubicados en la YPM (Cuadro 1, Figura 1). Se recolectaron muestras de hojas de maleza en sitios no agrícolas y en áreas de cultivo de chile, durante dos temporadas de infestación severa de mosquita blanca (de febrero a mayo y de julio a principios de octubre de 2017). Las

Table 1. Locations where the biological material was collected within the Yucatan (YS), and Campeche (CS) states in Mexico.

Cuadro 1. Ubicaciones donde se recolectó el material biológico en los estados de Yucatán (YS) y Campeche (CS), México.

| State | Region/ zone | District |
|----------|-----------------------------|--|
| Yucatan | Metropolitan influence zone | Conkal (10) ^z , Cholul (8), Chicxulub Pueblo (8), Dzitya (5), Hunucma (6), Hunuctaman (6), Merida (6), Uman (8) |
| | North-central coastal | Dzidzantun (6) |
| | East coastal zone | Espita (10) |
| | Western coastal zone | Halacho (6) |
| | South central zone | Cuzama (8) |
| | Southern zone | Catmis (6), Peto (10), Polinkin (6), Tixmehuac (6), Tekax (10) |
| Campeche | Southwestern zone | Timucuy (8), Subincancab (8) |
| | Region of Yaxchii | Hopelchen (10) |

^zNumbers between parentheses represent the number of plants collected by locality. / ^zLos números entre paréntesis representan el número de plantas recolectadas por localidad.

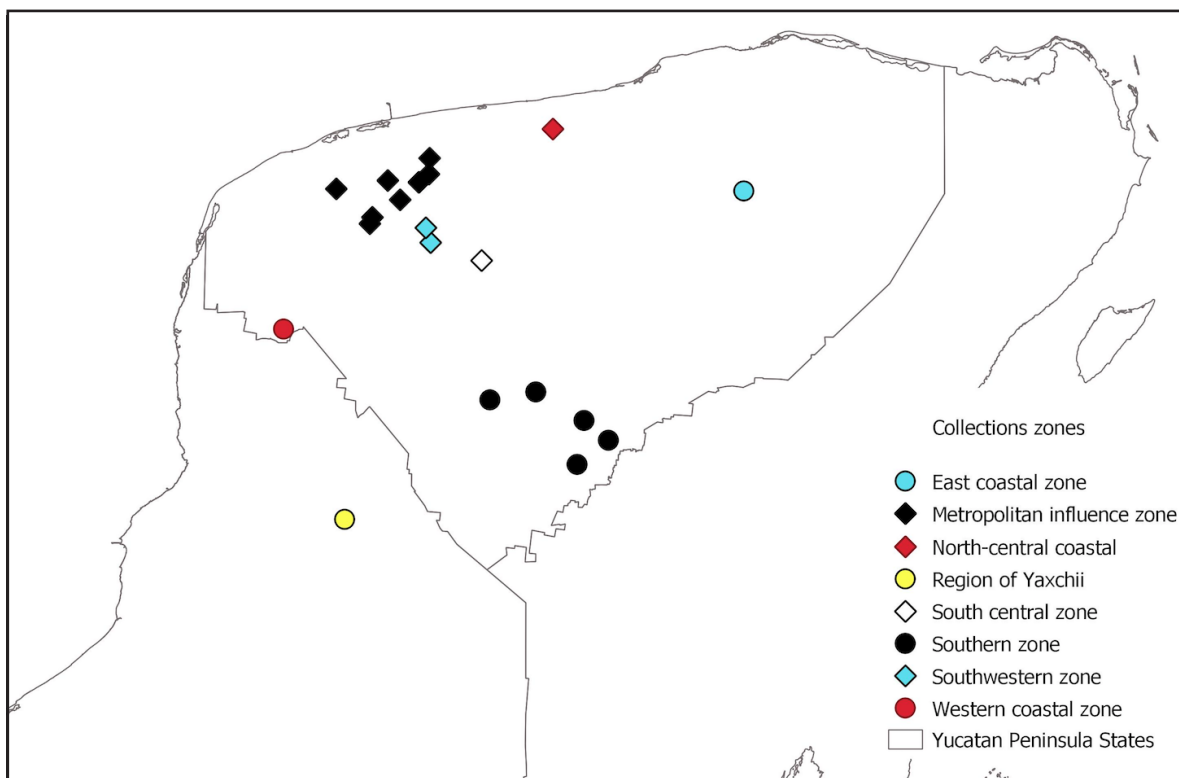


Figure 1. Map indicating the locations in the YPM, where symptomatic plants were collected for this study. Symbols represent the locations where the symptomatic plants were collected.

Figura 1. Mapa que indica las ubicaciones de la YPM en donde se recolectaron plantas sintomáticas para este estudio. Los símbolos representan los lugares donde se recolectaron las plantas sintomáticas.

infestation seasons (February-May and July to the beginning of October of 2017). The samples were stored -20 °C in the molecular virology laboratory of CICY, to serve as a source of viral DNA. Total genomic DNA from the leaves of pepper and weed plants was extracted according to the methods of Dellaporta *et al.* (1983) and Echevarria-Machado *et al.* (2005), respectively. Leaf samples were cleaned with sterile water before the DNA extraction in order to eliminate the possible contamination of whiteflies.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification, cloning, sequencing, and sequence analysis

The primer pair prAV324/AC889 was used for PCR amplification of the begomovirus diagnostic ~576 bp core coat protein (core *Cp*) gene fragment (Brown *et al.*, 2005), following the protocol recommended by the authors. Positive virus-specific PCR products of ~576 bp were purified with a QIAEX II kit (QIAGEN) and cloned into pGEM T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. The nucleotide sequences were determined with an ABI 377 sequencer (Davis Sequencing Co., CA, USA). Most clones were sequenced in forward and reverse directions. To enhance the possibility of detecting multiple begomovirus genotypes due to mixed infections in field samples, three to five PCR products were cloned and their nucleotide sequences analyzed. The nucleotide sequences (120) from randomly selected cloned samples (52) were edited manually to remove degeneracy imposed by the primers (EditSeq, DNASTAR version 5.08, Madison, WI, USA), resulting in a 533 nt sequence of the core *Cp*, and partial identification of *Begomovirus* species was done by comparing with sequences available in the NCBI-GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) by BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

muestras se almacenaron a -20 °C en el laboratorio de virología molecular del CICY para utilizarlas como fuente del ADN viral. El ADN genómico total de las hojas de plantas de chile y de maleza se extrajo de acuerdo con los métodos de Dellaporta *et al.* (1983) y Echevarría-Machado *et al.* (2005), respectivamente. Las muestras de hojas se limpiaron con agua destilada estéril antes de la extracción de ADN para eliminar una posible contaminación por mosquita blanca.

Amplificación, clonación, secuenciación y análisis de secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó el par de cebadores prAV324/AC889 para la amplificación por PCR del fragmento genómico de la región central del gen de la proteína de la capsida viral (core *Cp*) de ~576 pb para el diagnóstico de los begomovirus (Brown *et al.*, 2005), siguiendo el protocolo recomendado por los autores. Los productos de PCR específicos de begomovirus de ~576 pb se purificaron con un kit QIAEX II (QIAGEN) y se clonaron en el vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos se determinaron con un secuenciador ABI 377 (Davis Sequencing Co., CA, EE. UU.). La mayoría de las clonas se secuenciaron en dirección directa e inversa. Para aumentar la probabilidad de detectar múltiples especies de begomovirus en muestras de campo con infecciones mixtas, se clonaron de tres a cinco productos de PCR y se analizaron sus secuencias de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos (120) de muestras clonadas seleccionadas al azar (52) se editaron manualmente para reducir la degeneración en los cebadores (EditSeq, DNASTAR versión 5.08, Madison, WI, EE. UU.), lo que resultó en una secuencia de 533 nt del core *Cp*. La identificación parcial de especies

Sequence data analysis

For genetic and phylogenetic analysis, data of 25 selected core *Cp* partial begomoviruses sequences identified in the present study were used, 23 of which were isolated from species and landraces of *Capsicum* and two from different weed species. In addition, 36 reference standard sequences were obtained by cropping the core *Cp* of the full-length begomoviral genome from the GenBank database (Table 2), and included in the phylogenetic analysis. Multiple sequence alignment of the taxa was prepared with the CLUSTAL W in MegAlign (DNASTAR version 5.08, Madison, WI). Genetic distance matrix, diversity and pattern of nucleotide substitutions

de los Begomovirus se realizó mediante la comparación con secuencias disponibles en la base de datos NCBI-GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

Análisis de datos de las secuencias

Los análisis genéticos y filogenéticos se realizaron sobre los datos de 25 secuencias parciales del core *Cp* de begomovirus identificadas en el presente estudio, 23 de las cuales se aislaron de especies y variedades locales de *Capsicum* y de dos diferentes especies de maleza. Además, se obtuvieron 36 secuencias de referencia estándar, editando el core *Cp* del genoma begomoviral completo de secuencias obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 2).

Table 2. Geminivirus used in the nucleotide alignment and phylogenetic analyses and the respective virus acronym and GenBank accession number.

Cuadro 2. Geminivirus utilizado en el alineamiento de nucleótidos y análisis filogenéticos, con el respectivo acrónimo del virus y número acesión de GenBank.

| Geminivirus | Acronym | GB Acc No |
|---|---|-----------|
| <i>African cassava mosaic virus</i> -[Nigeria] | ACMV-[NG] | X17095 |
| <i>Abutilon mosaic virus</i> | AbMV | X15983 |
| <i>Bean calico mosaic virus</i> | BCaMV | AF11018 |
| <i>Bean golden mosaic virus</i> -[Brazil] | BGMV-[BR] | M88686 |
| <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> -[Mexico] | BGYMV-[MX] | AF17355 |
| <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> -[Guatemala] | BGYMV-[GT] | M91604 |
| <i>Cabbage leaf curl virus</i> | CaLCuV | U65529 |
| <i>Chino del tomate virus</i> | CdTV | AF22666 |
| <i>Corchorus yellow vein virus</i> | CYVV-[Hoa] | AY72790 |
| <i>Cotton leaf curl Gezira virus</i> | CLCuGV | AY03600 |
| <i>Cucurbit leaf crumple virus</i> -[Arizona] | CuLCrV-[Ari] | AF25620 |
| <i>Euphorbia mosaic virus</i> -[Yucatan Peninsula] | EuMV-[YP] | DQ31893 |
| <i>Euphorbia mosaic virus</i> ^t | H6-EuM-YP (<i>C. chinense</i> cv. Habanero) ^t | EU15585 |
| <i>Maize streak virus</i> | MSV-CP | NC00134 |
| <i>Melon chlorotic leaf curl virus</i> -[Guatemala] | MCLCuV-[GT] | AF32549 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Chiapas] | PepGMV-[Chi] | AF07702 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Costa Rica] | PepGMV-[CR] | AF14922 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Distorter] | PepGMV-[D] | AY92851 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Mo] | PepGMV-[Mo] | AY92851 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Serrano] | PepGMV-[Ser] | AY92851 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Tamaulipas] | PepGMV-[Tam] | U57457 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Nicaragua] | PepGMV-[Ni] | AJ842140 |

Table 2. Continue.
Cuadro 2. Continúa.

| Geminivirus | Acronym | GB Acc No |
|--|---|-----------|
| | 1-3-PepGMV (<i>D. sexangularis</i>) ^z | EU155830 |
| | 3-PepGMV (<i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) ^z | EU155831 |
| | 43-PepGMV (<i>C. annuum</i>) ^z | EU155834 |
| | 45-PepGMV <i>C.annuum</i> cv Cubano) ^z | EU155835 |
| | 120-PepGMV (<i>C. chinense</i> cv Habanero) ^z | EU155836 |
| | 122-PepGMV (<i>C. chinense</i> cv Habanero) ^z | EU155838 |
| | 138-PepGMV(<i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) ^z | EU155839 |
| | 144-PepGMV (<i>C. annuum</i> cv Xkatic) ^z | EU155841 |
| <i>Pepper golden mosaic virus</i> ^z | 151-PepGMV (<i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) ^z | EU155843 |
| | 164-PepGMV (<i>C. annuum</i> cv Xkatic) ^z | EU155844 |
| | 240-2-PepGMV (<i>C. annuum</i> cv Maax) ^z | EU155846 |
| | 250-2-PepGMV (<i>H. crispa</i>) ^z | EU155847 |
| | R3-PepGMV (<i>C. annuum</i>) ^z | EU155853 |
| | R6-PepGMV (<i>C. frutescens</i>) ^z | EU155854 |
| | R10-PepGMV (<i>C. chinense</i> cv Habanero) ^z | EU155855 |
| | R13-PepGMV <i>C. chinense</i> cv Scotch bonnet ^z | EU155856 |
| | R15-PepGMV (<i>C. annuum</i> cv Maax) ^z | EU155858 |
| | R16-PepGMV (<i>C. chinense</i> cv Habanero) ^z | EU155859 |
| | R12-PepGMV (<i>C. annuum</i> cv Maax) ^z | |
| <i>Pepper huasteco yellow vein virus</i> | PHYVV | X70418 |
| | 40-PHYVV (<i>C. annuum</i>) ^z | EU155833 |
| <i>Pepper huasteco yellow vein virus</i> ^z | 120- PHYVV (<i>C. chinense</i> cv Habanero) ^z | EU155837 |
| | 183- PHYVV (<i>C. chinense</i> cv Habanero) ^z | EU155845 |
| <i>Rhynchosia golden mosaic virus</i> | RhGMV | AF239671 |
| <i>Rhynchosia golden mosaic virus</i> -[Chiapas] | RhGMV-[Chi] | AF408199 |
| <i>Sida golden mosaic Costa Rica virus</i> | SiGMCRV | X99550 |
| <i>Sida golden mosaic virus</i> -[Florida] | SiGMV-[Flo] | AF049336 |
| <i>Sida golden mosaic Honduras virus</i> | SiGMHV | Y11097 |
| <i>Squash leaf curl virus</i> | SLCV | M38183 |
| <i>Tomato golden mosaic virus</i> -Yellow vein | TGMV-YV | K02029 |
| <i>Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus</i> | TMYLCAV | AY927277 |
| <i>Tomato mottle virus</i> -[Florida] | ToMoV-[Flo] | L14460 |
| <i>Tomato severe leaf curl virus</i> -[Guatemala] | ToSLCV-[GT] | AF130415 |
| <i>Tomato severe leaf curl virus</i> ^z | 144- <i>Tomato severe leaf curl virus</i> Gu ^z | EU155842 |
| <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Mild | TYLCV-Mld | X76319 |
| <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -[Dominican Republic] | TYLCV-[DR] | AF024715 |
| <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> ^z | 138-TYLCV DR (<i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) ^z | EU155840 |

^zBegomovirus clones isolated from plants collected in the states of Campeche and Yucatan. / ^zClonas de begomovirus aislados de plantas recolectadas en los estados de Campeche y Yucatán.

(total, synonymous and non-synonymous) analyses were complete with 23 PepGMV *CP* selected nucleotide sequences (Table 2). Selected PepGMV sequences included three samples of each *Capsicum* species and one sequence of each weed plant; the *CP* genomic region (CPR) comprised position 147-

Estas secuencias se incluyeron en el análisis filogenético. La alineación de secuencias múltiples de los taxones se realizó con CLUSTALW en MegAlign (DNASTAR versión 5.08, Madison, WI). El análisis de la matriz de distancia genética, la diversidad y el patrón de sustituciones de nucleótidos (total,

679 according to GenBank sequence AF077025. Molecular evolutionary testing was conducted using the Kimura 2-parameter and Kumar methods, Bootstrap analysis with 1000 replicates, with MEGA version 11 (Tamura *et al.*, 2021). Codon-based Z-test analysis averaging over all sequence pairs was performed to test for the selective force operating on CP sequences, using the Kumar method in MEGA 11. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option). There were a total of 177 positions in the final dataset. To reconstruct a phylogenetic tree, multiple aligned sequences were analysed by multiple parsimony using MEGA 11 with 1000 iterations per search. The strict consensus tree was constructed using the standard settings of MEGA 11, and statistical support for each major clade was calculated using Bootstrap with 1000 iterations per search. The tree was rooted using the CP sequence edited from the core CP sequence of the *Maize streak virus* (MSV-CP) of the genus *Mastrevirus*, family Geminiviridae (Table 2).

RESULTS

Search for viral symptoms in cultivated and field plants

In a disease survey during high whitefly infestation seasons at locations of the YS and CS (Figure 1), virus-like symptoms were collected on diverse cultivated and non-cultivated pepper and weed plants. All of sampled cultivated pepper plants, namely *C. chinense*, *C. a.* var. *annuum*, landrace Dulce, X'kat iik and Ya'ax iik, *C. frutescens*, and wild grown *C. a.* var. *aviculare* Maax iik, showed symptoms of golden mosaics, distorted leaves and stunting growth. Symptoms, clearly distinguished in *C. frutescens*, were often moderately perceived

sinónima y no sinónima) se realizó con 23 secuencias de nucleótidos del core Cp del PepGMV (Cuadro 2). Las secuencias del PepGMV seleccionadas incluyeron tres muestras de cada especie de *Capsicum* y una secuencia de cada maleza. La región genómica del core Cp (CPR) corresponde a la región del gen en las posiciones 147-679, de acuerdo a la secuencia del GenBank AF077025. Las pruebas evolutivas moleculares se realizaron utilizando los métodos de 2 parámetros de Kimura y Kumar. El análisis Bootstrap con 1000 repeticiones se realizó utilizando el software MEGA versión 11 (Tamura *et al.*, 2021). Se realizó una prueba Z basada en codones, promediando secuencias generales, para probar la fuerza selectiva que opera en secuencias del core Cp, utilizando el método Kumar en MEGA 11. Se eliminaron todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes (opción de eliminación completa). Hubo un total de 177 posiciones en el conjunto de datos final. Para reconstruir el árbol filogenético, se analizaron múltiples secuencias alineadas por parsimonia múltiple usando MEGA 11, con 1000 iteraciones por réplica. El árbol de consenso estricto se construyó usando la configuración estándar de MEGA 11. El soporte estadístico para cada clado principal se calculó usando Bootstrap con 1000 iteraciones por réplica. El árbol se enraizó usando la secuencia del core Cp editada del *virus del rayado del maíz* (MSV-CP) del género *Mastrevirus*, familia Geminiviridae (Tabla 2).

RESULTADOS

Búsqueda de síntomas virales en plantas cultivadas y de campo.

En un estudio de la enfermedad durante temporadas de alta infestación de mosquita blanca, en localidades de YS y CS (Figura 1), se encontraron plantas de chile de diferentes especies y maleza con

in one or two branches of Maax iik, rarely affecting the whole plant (Figure 2A). On the other hand, landrace X'kat iik (Figure 2B), Chile Dulce (Figure 2C and D) and Habanero chili (Figure 2E and F) plants showed noticeable foliar symptoms of varied severity, including yellowing with downward curly leaves, golden mosaics, and stunting growth. Comparable symptoms were recorded for weed

síntomas similares a los causados por virus. Todas las plantas de chile cultivadas colectadas, como *C. chinense*, *C. a.* var *annuum*, variedad local Dulce, X'kat iik y Ya'ax iik, *C. frutescens* y la especie silvestre *C. annum* var. *aviculare* Maax iik, mostraron síntomas como mosaicos dorados, deformación en las hojas y retraso en el crecimiento. En *C. frutescens* los síntomas se observaban claramente,



Figure 2. Symptoms observed in wild-grown (A) and cultivated (B, C, D, E and F) plants sampled at Catmis (A), Muna (B), Merida (C), Cuzama (D), and Tekax (E and F) infected with Begomovirus (PCR+). (A) *Capsicum annum* var. *aviculare* (Maax iik) plant showing branches with golden mosaic and distorted leaves, and stunting growth; (B) *C. annum* var. *annuum* (X'kat iik) with severe golden mosaic, and distorted leaves; (C and D) *C. annum* var. *annuum* (Chile Dulce) with severe golden mosaics, distorted leaves, and stunting growth; (E and F) *C. chinense* (Habanero type) with golden mosaics, and with downward curly leaves and severe stunting growth.

Figura 2. Síntomas observados en plantas silvestres (A) y cultivadas (B, C, D, E y F) muestreadas en Catmis (A), Muna (B), Mérida (C), Cuzama (D) y Tekax (E y F) infectadas con Begomovirus (PCR+). (A) *Capsicum annum* var. *aviculare* (Maax iik) que muestra ramas con mosaicos dorados, hojas distorsionadas y crecimiento atrofiado; (B) *C. annum* var. *annuum* (X'kat iik) con mosaico dorado severo y hojas distorsionadas; (C y D) *C. annum* var. *annuum* (Chile Dulce) con mosaicos dorados severos, hojas distorsionadas y crecimiento atrofiado; (E y F) *C. chinense* (tipo Habanero) con mosaicos dorados, hojas rizadas hacia abajo y crecimiento gravemente atrofiado.

species (images not shown). Nevertheless, in the majority of cases, chili plants showing small curled leaves were stunted and bushy in appearance because of reduced length internodes (Figure 2D).

Begomoviruses preliminary identification

Of the total collected plant samples (151), including 146 peppers and 5 weeds, 90.1% were PCR positive using the core *CP* primer (Table 3). That is, 89.7% of the peppers (131), including plant samples of all the pepper species and all the weed (5) plant samples were positive to begomoviruses. Sequencing of amplicons, on average two to three per sample of plants (52), uncovered the likely incidence of single and mixed begomovirus infections. Of these, virus species determined in 120 sequenced clones were

mientras que en el chile Maax iik, a menudo aparecían moderadamente presentes en una o dos ramas y rara vez afectaban a toda la planta (Figura 2A). Las variedades locales X'kat iik (Figura 2B), Chile Dulce (Figura 2C y D) y Chile Habanero (Figura 2E y F) mostraron síntomas foliares notables de diversa gravedad, que incluyen amarillamiento, hojas rizadas hacia abajo, mosaicos dorados y retraso en el crecimiento. Se observaron síntomas comparables en especies de maleza (imágenes no mostradas). En la mayoría de los casos, las plantas de chile mostraron hojas pequeñas y rizadas y tenían un aspecto atrofiado y tupido, debido a la longitud reducida de los entrenudos (Figura 2D).

Identificación preliminar de Begomovirus

Del total de muestras de plantas colectadas (151), incluyendo 146 chiles y cinco plantas de

Table 3. Provisional sequence identification of Begomovirus (identity >89% nt) found in samples of cultivated*, semi-cultivated[‡], wild † grown pepper plants and weed (w) plants collected in the state of Yucatan. Viruses revealed by PCR with universal primers for the core *Cp*. Number of +PCR positives clones over total sampled plants per species and/or landrace type. In parenthesis number of positive sequenced clones, underlined are the possible mixed virus infections found.

Cuadro 3. Identificación provisional de Begomovirus (identidad >89% nt) basado en secuencias parciales, encontrada en muestras de plantas de chile cultivadas*, semicultivadas[‡], silvestres† y plantas de maleza (w) recolectadas en el estado de Yucatán y Campeche. Virus amplificados por PCR con cebadores universales para core *Cp*. Número de clonas positivas +PCR sobre el total de plantas muestreadas por especie y/o tipo de raza local. Entre paréntesis, el número de clonas secuenciadas positivas. Las posibles infecciones virales mixtas aparecen subrayadas.

| Host species | No. +PCR / total samples | Virus species identity >89% nt
(No. of sequenced clones to core <i>Cp</i>) |
|---|--------------------------|--|
| <i>Capsicum chinense</i> (habanero) [‡] | 53/57 | (35) PepGMV, (6) PHYVV, (2) ToSLCV, (4) EuMV-YP, <u>1PepGMV:1PHYVV</u> |
| <i>C. annuum</i> var. <i>Annuum</i> (dulce)* | 16/18 | (12) PepGMV, (3) ToSLCV, <u>1PepGMV:1TYLCV</u> . |
| <i>C. a. var. Annuum</i> (X'kat iik)* | 11/12 | (9) PepGMV, <u>1PepGMV:1ToSLCV</u> . |
| <i>C. a. var. Annuum</i> (Ya'ax iik) [‡] | 8/8 | (7) PepGMV |
| <i>C. frutescens</i> (Pico de paloma) [‡] | 6/8 | (5) PepGMV |
| <i>C. a. var. aviculare</i> (Maax iik) [†] | 37/43 | (18) PepGMV |
| <i>Callicarpa</i> spp (w) | 1/1 | (3) PepGMV |
| <i>Croton malvaviscifolius</i> (w) | 1/1 | (3) PepGMV |
| <i>Nicotiana tabacum</i> (w) | 1/1 | (3) PepGMV |
| <i>Dicliptera sexangularis</i> (w) | 1/1 | (2) PepGMV |
| <i>Herissantia crispa</i> (w) | 1/1 | (2) PepGMV |

provisionally identified based on the comparison of nucleotide identity (>89% nt) with viral core CP sequences of well-studied begomoviruses (Table 3). Single infections with *Pepper golden mosaic virus* PepGMV predominated, representing 82.5% of the sequenced clones (99) detected in materials of the different *Capsicum* species and in the weed species *Callicarpa* spp., *C. malvaviscifolius*, *D. sexangularis*, *H. crispa*, and *N. tabacum* (Table 3). This was followed by *Pepper huasteco yellow vein virus* PHYVV (5 %) found in two *C. chinense* plants, one clone isolated from Habanero and the other from Scotch Bonnet type, plus the *Tomato severe leaf curl virus* ToSLCV (4.2%) found in the Habanero and Dulce plants. Interestingly, four sequenced clones (3.3%) from a single Habanero chili plant (sample H6 EuMV-YP[*C. chinense* H]) displayed high identity (98-99%) to the *Euphorbia mosaic virus*-[Yucatan Peninsula] EuMV-YP isolate described from *Euphorbia heterophylla* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b). Possible mixed infections were confirmed by bi-directionally searching of three to five clones of each partial begomoviral species isolated from each plant. These included a mixture of PepGMV-PHYVV in the Habanero chili (sample 120, *C. chinense* H), the PepGMV-TYLCV in the Dulce pepper (sample 138, *C. annum* D) and the PepGMV-ToSLCV in a X'kat iik plant (sample 144, *C. annum*, Table 3).

Genetic variation of PepGMV isolates based on nucleotide distance analysis from partial DNA-A begomovirus sequences

Genetic distance analysis based on pairwise analysis of 23 chosen core CP nucleotide sequences (Table 4) indicated that PepGMV isolates were closely related strains sharing from 95 to 99% nucleotide sequence identity; percentage nt identity was calculated as $[1 - \text{genetic distance}] \times 100$

maleza, el 90.1% fueron PCR positivas con los cebadores que amplifican el core Cp (Cuadro 3). Es decir, el 89.7% de los chiles (131), incluyendo las muestras de plantas de todas las especies de chile y todas las muestras de maleza (5), fueron positivas para begomovirus. La secuenciación de los amplicones, en promedio de dos a tres por muestra de planta (52), reveló la probable incidencia de infecciones simples y mixtas de begomovirus. Las especies de virus detectadas en 120 clonas secuenciadas se identificaron provisionalmente en base a comparaciones de identidad de nucleótidos (> 89% nt) con secuencias del core Cp viral de begomovirus reportados previamente (Cuadro 3). Las infecciones simples con el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) fueron las más frecuentes, representando el 82.5% de las clonas secuenciadas (99), detectados en hojas de las diferentes especies de *Capsicum* y en las especies de maleza *Callicarpa* spp., *C. malvaviscifolius*, *D. sexangularis*, *H. crispa* y *N. tabacum* (Cuadro 3). Le siguió el virus de la vena amarilla del pimiento huasteco (PHYVV) (5%), que se encontró en dos plantas de *C. chinense*, una clona aislada de Habanero y el otro de tipo Scotch Bonnet. Además, se encontró el virus del enrollamiento severo de la hoja del tomate (ToSLCV) (4.2%) en plantas de Habanero y Dulce. Curiosamente, cuatro clonas secuenciadas (3.3%) de una sola planta de chile habanero (muestra H6 EuMV-YP[*C. chinense* H]) mostraron una alta identidad (98-99%) con el virus del mosaico de Euphorbia-[Península de Yucatán] EuMV-YP aislado en *Euphorbia heterophylla* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b). Las posibles infecciones mixtas se confirmaron realizando una búsqueda bidireccional de la secuencia parcial de tres a cinco clonas de cada especie begomoviral aislada en cada planta. Estas incluyeron una mezcla del PepGMV-PHYVV en chile Habanero (muestra 120, *C. chinense* H), PepGMV-TYLCV en chile Dulce

(Brown *et al.*, 2005). The average nt distance of CPR estimated for the number of base substitutions per site over all 23 sequence pairs was equal to 0.027 (± 0.004 SE), with a calculated transitional to transversal distance per site ratio (R) equal to 0.641 (± 0.21 SE). In general, the estimated average codon-based divergence of all sequence pairs showed a low value of nonsynonymous (dN) substitutions to synonymous (dS) substitutions, $dN = 0.003 < dS = 0.130$, and a low dN / dS ratio of 0.023 (Table 4), respectively.

Phylogenetic analysis based on partial DNA-A begomovirus sequences

The phylogenetic analysis examined the probable relationship between begomovirus-infected pepper and those of weed species collected in the YS and CS relative to their corresponding sequences from a database (Gen-Bank). The analysis incorporated the nt sequences of the Coat protein gene (*CP*) core region from 61 taxa. The matrix was constructed with 23 nt sequences isolated from *Capsicum* spp., two from plants grown as weeds (Table 3), and 36 from Gen-Bank sequences (Table 2). The evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony method. The most parsimonious tree with length = 3191 was shown (Figure 3). The consistency index is 0.376378 (0.309704), the retention index is 0.634911 (0.634911) and the composite index is 0.238966 (0.196634) for all sites and parsimony-informative sites (in parentheses). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) were shown next to the branches. The MP tree was obtained using the Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algorithm with search level 1 in which the initial trees were obtained by the random addition of sequences (10 replicates). There were a total

(muestra 138, *C. annuum* D) y PepGMV-ToSLCV en una planta X'kat iik (muestra 144, *C. annuum*, Cuadro 3).

Variación genética de aislados del PepGMV basada en análisis de distancia de nucleótidos a partir de secuencias parciales del ADN-A de begomovirus

El análisis de distancia genética basado en el análisis por parejas de 23 secuencias de nucleótidos del core *Cp* seleccionadas (Cuadro 4), indicó que los aislados del PepGMV son cepas estrechamente relacionadas, que compartían entre 95 y 99% de identidad de secuencia de nucleótidos. El porcentaje de identidad de nt se calculó como $[1 - \text{distancia genética}] \times 100$ (Brown *et al.*, 2005). La distancia promedio de nt del CPR estimada para el número de sustituciones de bases por sitio en los 23 pares de secuencias fue igual a 0.027 (± 0.004 SE), con una distancia de transición a transversión calculada por proporción de sitio (R) igual a 0.641 (± 0.21 SE). En general, la divergencia promedio estimada basada en codones de todos los pares de secuencias mostró un valor bajo de sustituciones no sinónimas (dN) a sustituciones sinónimas (dS) ($dN = 0.003 < dS = 0.130$) y una proporción dN/dS baja de 0.023 (Cuadro 4).

Análisis filogenético basado en secuencias parciales del ADN-A de begomovirus

El análisis filogenético analizó la relación probable entre los begomovirus encontrados que infectan chiles y aquellos que infectan especies de maleza colectadas en YS y CS, según sus secuencias correspondientes en el GenBank. El análisis incorporó las secuencias de nt de la región central del gen de la proteína de la capsida (core *Cp*) de 61 taxones. La matriz se construyó con secuencias

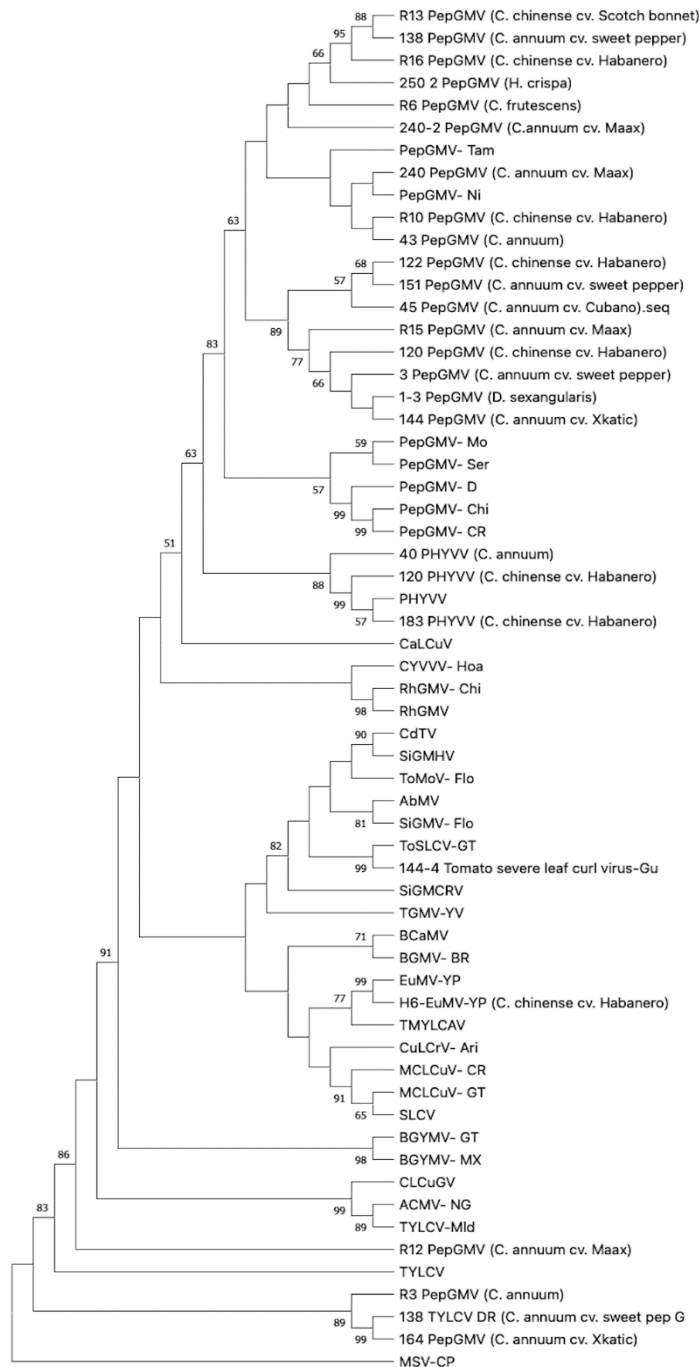


Figure 3. Cp sequence-inferred phylogenetic relationships of begomoviruses identified in field-grown and cultivated pepper plants from Yucatan and Campeche, Mexico; the analysis also includes the Cp sequence of selected, well-studied begomoviruses which are available in GenBank. Presented is the single most parsimonious tree; numbers placed at nodes represent Bootstrap values over than 50%, lower values are not shown (1000 iterations).

Figura 3. Relaciones filogenéticas inferidas por la secuencia parcial del core *Cp* de begomovirus identificados en plantas de chile cultivadas y silvestres provenientes de Yucatán y Campeche, México. El análisis también incluye la secuencia del core *Cp* de begomovirus seleccionados y bien estudiados que están disponibles en el GenBank. La figura muestra el árbol más parsimonioso. Los números colocados en los nodos representan valores de Bootstrap superiores al 50%. Los valores más bajos no se muestran (1000 iteraciones).

of 566 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11. The cluster of Eastern Hemisphere begomoviruses with a 99% Bootstrap supported value includes the *Tomato yellow leaf curl virus*, of which clone 138-TYLCV-[*C. annum* D], isolated from a single plant with a likely mix infection (Table 3, Figure 3), showed high identity (99%) to the Dominican Republic isolate of TYLCV. Interestingly, a divergent clade containing three clones of PepGMV isolates from different *C. annum* cultivars was observed close to the MSV-CP, the *Mastrevirus* that was selected as root of the phylogenetic tree, with 89% Bootstrap supported value. The Western Hemisphere cluster divides into two subclades (63% support node). One group holds the *Tomato severe leaf curl virus* clone 144-ToSLCV-[*C. annum* X]), isolated from a X'kaat ik plant with a probable mixed infection (Table 3, Figure 3). This is related to the ToSLCV-[GT] reference isolate (82% Bootstrap), shares common nodes with other begomoviruses, and is grouped with species of *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), *Tomato mottle virus* (ToMoV), *Chino del tomate virus* (CdTV), and *Abutilon mosaic virus* (AbMV). The second group, with two branches, contains the pepper isolate of the *Euphorbia mosaic virus* isolate, H6 EuMV-YP (*C. chinense* H) with its sister species, the EuMV-YP reference isolate (99% Bootstrap) and the *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (TMYLCAV), a relation supported by a 77% value (Figure 3). The former groups are assembled with a begomovirus species that received no Bootstrap support, including the SLCV clade. The other relationships inferred for the collections with no Bootstrap support are subdivided into two subclades. One subclade comprising the *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) cluster is grouped with three isolates from *C. chinense*, clones 120 and 183 of PHYVV-from Habanero and the 40-PHYVV isolate from the

de 23 nt aisladas de *Capsicum* spp., dos de maleza (Cuadro 3) y 36 de secuencias publicadas en el GenBank (Cuadro 2). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Parsimonia. La Figura 3 muestra el árbol más parsimonioso, con una longitud =3191. El índice de consistencia es 0.376378 (0.309704), el índice de retención es 0.634911 (0.634911) y el índice compuesto es 0.238966 (0.196634) para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia (entre paréntesis). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon por Bootstrap (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. El árbol MP se generó utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (nivel de búsqueda 1). Los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). Hubo un total de 566 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11. El grupo de begomovirus del hemisferio oriental con un valor de Bootstrap del 99% incluye el virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*), del cual la clona 138-TYLCV-[*C. annum* D], aislado de una planta con una probable infección mixta (Cuadro 3, Figura 3), mostró una alta identidad (99%), con el aislado de TYLCV de la República Dominicana. Curiosamente, se observó un clado divergente que contenía tres clones de aislados del PepGMV de diferentes cultivares de *C. annum* cerca del MSV-CP, el *Mastrevirus*, que se seleccionó como la raíz del árbol filogenético, con un 89 % del valor de Bootstrap. El grupo del Hemisferio Occidental se divide en dos subclados (63% soporte del nodo). Un grupo incluye el virus del enrollamiento severo de la hoja del tomate (*Tomato severe leaf curl virus*) clon 144-ToSLCV-[*C. annum* X]), aislado de una planta X'kaat ik con una probable infección mixta (Cuadro 3, Figura 3). Este grupo está asociado con el aislado de referencia ToSLCV-[GT] (82%

Maax iik plant, with 88 to 99 % Bootstrap values. The second subclade is composed of collections of the *Pepper golden mosaic virus* PepGMV from the most of the pepper and weed isolates set with well-known begomovirus reference isolates forming a major PepGMV clade supported by Bootstrap (83%). This PepGMV clade visibly split into three subclades (Bootstrap 89%) (Figure 3). Two clones of PepGMV, R3 and 164 were grouped in a separate clade with TYLCV-DR, with 89% of Bootstrap support. A future analysis with the complete sequence of the A Component of both clones should be necessary, in order to corroborate this phylogenetic relationship.

DISCUSSION

Plant viruses have enormous potential for genetic variation and rapid evolution; although mutation, reassortment, and recombination are known as mechanisms that generate variation, less is known about the selection pressures that operate and drive their evolution (Font *et al.*, 2007; Garcia-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006). Evidence is provided here that YPM infections by members of the genus *Begomovirus* are common in cultivated peppers, as well as non-cultivated weed plants. Nearly all plants in fields with cultivated peppers, landrace Dulce, X'kat ikk, Ya'ax ikk, Pico de Paloma, and Habanero chili analyzed during this work showed severe symptoms. In fact, most of the collected tested samples (90%) were PCR begomovirus-positive (PCR-BG-+), in which the conserved core Coat Protein region of the *AVI* gene was used for the provisional identification of begomoviruses. This partial sequence provides provisional virus identification, while for definite classification, complete DNA-A and DNA-B particle sequences are required (Brown *et al.*, 2001; Fauquet *et al.*, 2003). Actually, Central America,

de Bootstrap), comparte nodos comunes con otros begomovirus y se agrupa con especies del virus del mosaico dorado de Sida (*Sida golden mosaic virus* -SiGMV), el virus del moteado del tomate (*Tomato mottle virus* -ToMoV), el virus del Chino del tomate (*Chino del tomate virus* - CdTV) y el virus del mosaico de Abutilon (*Abutilon mosaic virus* - AbMV). El segundo grupo, con dos ramas, incluye una clona del virus del mosaico de Euphorbia (*Euphorbia mosaic virus*), H6 EuMV-YP (*C. chinense* H), aislado de Chile, con su especie hermana, el aislado de referencia EuMV-YP (99% de Bootstrap) y el virus del encrespado amarillo de la hoja del tomate (*Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* - TMYLCAV), relación sustentada con un valor de Bootstrap del 77% (Figura 3). Los primeros grupos se ensamblan con una especie de begomovirus que no recibió soporte de Bootstrap, incluido el clado SLCV. Las otras relaciones inferidas para las colecciones no tienen soporte de Bootstrap y se subdividen en dos subclados. Un subclado que comprende el cluster del virus huasteco de la vena amarilla del Chile (*Pepper huasteco yellow vein virus* - PHYVV) se agrupa con tres aislados de *C. chinense*, las clonas 120 y 183 de PHYVV- de Habanero y el aislado 40-PHYVV de la planta Maax iik, con 88 a 99 % de valores Bootstrap. El segundo subclado está formado por secuencias del virus del mosaico dorado del Chile (*Pepper golden mosaic virus* - PepGMV) de la mayoría de los aislamientos de Chile y maleza con aislamientos de referencia de begomovirus bien conocidos, formando un clado principal del PepGMV respaldado por Bootstrap (83%). Este clado del PepGMV se dividió visiblemente en tres subclados (Bootstrap 89%) (Figura 3). Dos clonas del PepGMV, R3 y 164, se agruparon en un clado separado con el TYLCV-DR, con un 89% de soporte de Bootstrap. Es necesario un análisis posterior con la secuencia completa del Componente A de ambas clonas para corroborar esta relación filogenética.

México, and Brazil appear to be important Western Hemisphere centers of begomovirus diversity (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019). Actually, more than 440 begomovirus species are reported, and among these a large number are emerging pathogens of pepper, bean (*Phaseolus vulgaris*), cotton (*Gossypium* sp.), cucurbits, okra (*Abelmoschus esculentus*), papaya (*Carica papaya*), tomato (*Solanum lycopersicum*), and weed plants (ICTV, 2022). In a previous study, from 119 symptomatic plants belonging to 16 different species, only 58% of the YPM samples were positive to begomovirus. In these samples, 13 distinct begomovirus species were identified, including the PepGMV isolated from *C. annuum* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). In contrast, almost 90% of the analyzed samples in this work were positive to PepGMV. In both cases, all the collected plants showed viral symptoms. As reported before, one possibility is that some symptomatic plants collected here were infected with other viruses that produce similar symptom (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). Another report showed that geminivirus infection in tomato, with similar symptoms to those caused by geminivirus was induced by Potyviridae and Tobamoviridae (Polston and Anderson, 1997). It is notable that *C. annuum* var. *aviculare* Maax iik plants examined here did show mild symptoms present in even one branch of the plant and rarely in two. Yet 86% of the collected material of Maax iik was PCR-BG+. Symptom remission or host recovery has been associated with specific resistance of pepper plants to PepGMV, and silencing mechanisms in the recovery process have been suggested (Carrillo-Trip *et al.*, 2007). This is important, as evidence from the literature suggests that the sources of resistance to PHYVV and PepGMV are to be found within wild relatives of *C. annuum* and some

DISCUSIÓN

Los virus de las plantas tienen un enorme potencial para la variación genética y la rápida evolución. La mutación, el reordenamiento y la recombinación son mecanismos conocidos que generan variación genética, pero se sabe poco sobre las presiones de selección que operan e impulsan su evolución (Font *et al.*, 2007; Garcia-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006). Aquí se proporciona evidencia de que las infecciones en la YPM causadas por miembros del género Begomovirus son comunes en chiles cultivados y plantas de maleza. Casi todas las plantas de Chile cultivadas en campo estudiadas en el presente trabajo, incluidas las variedades locales Dulce, X'kat iik, Ya'ax iik, Pico de Paloma y Chile habanero, mostraron síntomas graves de infección por Begomovirus. De hecho, la mayoría de las muestras recolectadas (90%) fueron positivas para begomovirus por PCR (PCR-BG+). La región central conservada del gen *AVI* de la proteína de la capsida (core *Cp*) se utilizó para la identificación provisional de los begomovirus. Esta secuencia parcial permitió la identificación provisional del virus. Para una clasificación definitiva, se requieren secuencias completas de los componentes ADN-A y ADN-B (Brown *et al.*, 2001; Fauquet *et al.*, 2003). Centroamérica, México y Brasil parecen ser importantes centros de diversidad de begomovirus en el hemisferio occidental (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019). Se han reportado más de 440 especies de begomovirus, incluyendo un gran número de patógenos emergentes que afectan Chile, frijol (*Phaseolus vulgaris*), algodón (*Gossypium* sp.), cucurbitáceas, okra (*Abelmoschus esculentus*), papaya (*Carica papaya*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y maleza (ICTV, 2022). En un estudio anterior, de 119 plantas sintomáticas pertenecientes a 16 especies

accessions of *C. chinense* (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernandez-Verdugo *et al.*, 2001).

Based on the *Cp* sequences, the five partially identified species of begomovirus associated with cultivated pepper plants in the YPM are in accordance with those described by other authors (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Godinez-Hernandez *et al.*, 2001; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). The unusual finding of EuMV-YP infecting a Habanero chili plant, reported here, is remarkable given that this viral species commonly lives in the neotropical weed *Euphorbia heterophylla* (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). In Mexico, this virus was reported in the YPM and in Jalisco (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a). In Cuba, it was reported that the EuMV infects tobacco plants collected in the field (Fiallo-Olive, 2010). Although experimental data have confirmed that *P. vulgaris*, *S. lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, *C. annuum*, *C. chinense*, *Cnidoscolus chayamansa*, *Jatropha curcas*, *Ricinus comunis*, *Arabidopsis thaliana*, and *Nicotiana tabacum* plants are hosts of EuMV-YP (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013), additional field studies are needed to establish the extent of host range and distribution of EuMV-YP in Mexico and other countries of Central and South America.

In the present study, PepGMV was the most widespread begomoviral species found to infect cultivated *C. chinense*, *C. annuum* landrace Dulce and X'kat iik, the home-garden grown *C. frutescens*, and wild grown Maax iik, as well as collected weed plants in the YPM. Most weed samples should be analyzed in order to look for PepGMV infection in the YPM. This species has also been reported in Central America, infecting

diferentes, solo el 58% de las muestras de la YPM fueron positivas a begomovirus. En ese estudio, se identificaron 13 especies distintas de begomovirus, incluido el PepGMV aislado de *C. annuum* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). Por el contrario, casi el 90% de las muestras analizadas en el presente trabajo fueron positivas para PepGMV. En ambos casos, todas las plantas recolectadas presentaron síntomas virales. Como se comentó anteriormente, una posible explicación es que algunas plantas sintomáticas recolectadas en el presente estudio estaban infectadas con otros virus que producen síntomas similares (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). Otro reporte mostró que una infección de tomate con síntomas similares a los causados por geminivirus fue inducida por Potyviridae y Tobamoviridae (Polston y Anderson, 1997). Es notable que las plantas de *C. annuum* var. *s. aviculare* Maax iik examinadas en el presente estudio mostraron síntomas leves en una rama de la planta y rara vez en dos. Sin embargo, el 86% del material recolectado de Maax iik fue PCR-BG+. La remisión de los síntomas o la recuperación del huésped se ha asociado con la resistencia específica de las plantas de Chile al PepGMV y se han sugerido mecanismos de silenciamiento en el proceso de recuperación (Carrillo-Trip *et al.*, 2007). Esto es importante, ya que la evidencia de la literatura sugiere que las fuentes de resistencia a PHYVV y PepGMV se encuentran entre los parientes silvestres de *C. annuum* y algunas accesiones de *C. chinense* (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernández-Verdugo *et al.*, 2001).

En base a las secuencias del core *Cp*, las cinco especies de begomovirus parcialmente identificadas asociadas a plantas de Chile cultivadas en la YPM concuerdan con las descritas por otros autores (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Godinez-Hernandez *et al.*, 2001; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007b; Morales-Aguilar *et*

peppers in Costa Rica and Honduras (Lotrakul *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2005), and tomato, pepper, and cucurbits in Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005). In addition, tested samples of Habanero chili showed a single infection with PHYVV and ToSLCV, consistent with other studies reported for other parts of Mexico and Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). Moreover, the finding of an isolate of TYLCV reported here in a possible mixture with PepGMV infecting a single plant of *C. annuum* Dulce is supported by earlier reports of the presence of TYLCV in tomato in Yucatan since 1999 Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999). This strain of TYLCV shares 99% identity with the Dominican Republic strain (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999), a strain that is considered a component of the Eastern North American and Caribbean clade (ENAC) of TYLCV (Duffy and Holmes, 2007). The other possible mixed infections, PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV and PepGMV-ToSLCV, frequently occur in association with only cultivated peppers, such as Habanero chili and *C. annuum* var. *annuum*, landrace Dulce and X'kat ikk, in farming areas where striking whitefly infestations were recorded (Escobedo-García Medrano, unpublished data). It is remarkable that PepGMV and PHYVV mixed infections indeed occur naturally in many horticultural crops in México, where the distribution of the two viruses often overlaps (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). Symptom expression in PepGMV-PHYVV interactions seems to be host-dependent (Mendez-Lozano *et al.*, 2003). Future research on PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV, and PepGMV-ToSLCV interactions should address the biological significance of each mixture, how their respective genomes interact with the host cell genome during each of these mixed infections, and what is their relationship to the vector biotype involved in their transmission.

al., 2019). El hallazgo inusual del EuMV-YP infectando una planta de chile habanero, reportado aquí, es notable dado que esta especie viral comúnmente infecta la maleza neotropical *Euphorbia heterophylla* (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007c). En México, este virus ha sido reportado en la YPM y en Jalisco (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a). En Cuba se reportó que el EuMV infecta plantas de tabaco recolectadas en el campo (Fiallo-Olive, 2010). Aunque los datos experimentales han confirmado que las plantas *P. vulgaris*, *S. lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, *C. annuum*, *C. chinense*, *Cnidoscolus chayamansa*, *Jatropha curcas*, *Ricinus communis*, *Arabidopsis thaliana* y *N. tabacum* son hospederos del EuMV-YP (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007b; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013), se requieren estudios de campo adicionales para establecer la extensión del rango de hospederos y la distribución del EuMV-YP en México y otros países de América Central y del Sur.

En el presente estudio, el PepGMV fue la especie de begomovirus más extendida que se encontró infectando a *C. chinense* cultivada, *C. annuum* variedad local Dulce y X'kat iik, a *C. frutescens* cultivada en huertos domésticos y la planta silvestre Maax ikk, así como a la maleza recolectada en la YPM. Se deben analizar más muestras de maleza para establecer la distribución del PepGMV en estas plantas en la YPM. Esta especie de virus también ha sido reportada en América Central, infectando chiles en Costa Rica y Honduras (Lotrakul *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2005), así como plantas de tomate, chile y cucurbitáceas en Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005). Además, las muestras analizadas de chile habanero presentaron una infección simple con el PHYVV y el ToSLCV, en concordancia con los resultados de otros estudios en otras partes de México y Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-

The results shown here concerning *C. annuum* var. *aviculare*, Maax iik, and the weed, e.g., *D. sexangularis*, and *H. crispa* are relevant because they demonstrate that native hosts could be reservoirs of genetic diversity for PepGMV-associated viruses. This may be important for the understanding of epidemic dynamics and evolution of the viruses under the prevailing conditions in YPM. Support for this comes from this fact: although Maax iik plants showed mild virus symptoms when collected, the majority that tested BG positive by PCR (86.05%) turned out to be infected by the partially identified PepGMV. It is interesting to note that the genetic evidence provided here concerning a low genetic diversity within PepGMV (particularly the low nucleotide substitutions of dN/dS ratio in the CP-core gene region (CPR) analyzed) strongly suggests that a negative selective pressure (dN/dS) is operating on the gene region analyzed. This is comparable to that reported for TYLCV (Font *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

In this work, almost 90% of the sampled plants were positive to begomovirus, including the partially identified species of PepGMV, PHYVV, ToSLCV, TYLCV and EuMV-YP. Single infections with PepGMV predominated, representing 82.5% of the sequenced clones. Mixed infection including the PepGMV-PHYVV the PepGMV-TYLCV and the PepGMV-ToSLCV were observed in different plant species. These partial sequences provide provisional virus identification isolates in the YPM, while for definite classification and phylogenetic analyzes, complete DNA-A and DNA-B component sequences will be required.

Aguilar *et al.*, 2019). En el presente estudio, el hallazgo de un aislado de TYLCV en posible combinación con el PepGMV que infecta una planta de *C. annuum* Dulce, está respaldado por reportes anteriores de la presencia de TYLCV en plantas de tomate en Yucatán desde 1999 (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999). Esta cepa de TYLCV comparte un 99% de identidad con la cepa de República Dominicana (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999), una cepa que se considera un componente del clado del este de América del Norte y el Caribe (ENAC) del TYLCV (Duffy y Holmes, 2007). Las otras posibles infecciones mixtas, de PepGMV-PHYVV, de PepGMV-TYLCV y de PepGMV-ToSLCV, se presentaron frecuentemente en asociación solo con chiles cultivados, como el chile habanero y *C. annuum*. Var. *annuum*, variedad local Dulce y X'kat iik, en áreas de cultivo con registros de infestaciones de mosquita blanca (Escobedo-García Medrano, datos no publicados). Es de destacar que las infecciones mixtas con el PepGMV y el PHYVV ocurran naturalmente en muchos cultivos hortícolas en México en donde la distribución de los dos virus a menudo se superpone (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). La expresión de síntomas en las interacciones de PepGMV-PHYVV parece depender del hospedero (Mendez-Lozano *et al.*, 2003). Las investigaciones futuras sobre las interacciones PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV y PepGMV-ToSLCV deberían abordar la importancia biológica de cada combinación, cómo interactúan sus respectivos genomas con el genoma de la célula hospedera durante cada una de estas infecciones mixtas y cuál es su relación con el biotipo del vector implicado en su transmisión.

Los resultados del presente estudio sobre *C. annuum* var. *aviculare*, Maax iik y maleza (p. ej., *D. sexangularis* y *H. crispa*) son relevantes porque

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Jose Luis Tapia for his help with the plant collections and plant identification, and Celene Espadas for her technical assistance with the map elaboration.

CITED LITERATURE

- Ala-Poikela M, Svensson E, Rojas A, Horko T, Paulin L, Valkonen JPT and Kvarneden A. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* 54: 448-459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01226.x>.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* 25: 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Anaya-Lopez JL, Torres-Pacheco I, Gonzalez-Chavira M, Garzon-Tiznado JA and Pons-Hernandez JL. 2003. Resistance to geminivirus mixed infections in mexican wild peppers. *HortScience* 38: 251-255. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.2.251>.
- Ascencio-Ibañez JT, Diaz-Plaza R, Mendez-Lozano J, Monsalve-Fonnegra ZI, Argüello-Astorga GR and Rivera-Bustamante RF. 1999. First Report of Tomato yellow leaf curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease* 83: 1178. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1178A>.
- Bosland PW and Votova EJ. 2000. Peppers: Vegetable and spice Capsicums, *Crop Production Science in Horticulture* 12, CABI International UK. <https://doi.org/10.1079/9781845938253.0000>.
- Brown JK, Frohlich D and Rosell R. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* 40: 511-534. <https://www.annualreviews.org/toc/ento/40/1>.
- 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: 1217-1224. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1217>.
- Brown JK, Idris AM, Torres-Jerez I, Banks GK and Wyatt D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology* 146: 1581-1598. <https://doi.org/10.1007/s007050170080>.
- 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: 51-59. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0051>.
- Cazares-Sanchez E, Ramirez-Vallejo P, Castillo-Gonzalez F, Soto-Hernandez M, Rodriguez-Gonzalez MT y Chavez-Servia JL. 2005. Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annuum* L.) del Centro-Oriente de Yucatán. *Agrociencia* 39: 627-638. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30239606.pdf>.

demuestran que los hospederos silvestres podrían ser reservorios de diversidad genética para los virus asociados con el PepGMV. Esto puede ser importante para la comprensión de la dinámica epidemiológica y la evolución de los virus en las condiciones imperantes en la YPM. Esta conclusión está respaldada por este hecho: aunque las plantas de Maax ikk mostraron síntomas leves del virus cuando se recolectaron, la mayoría de las que dieron positivo a BG por PCR (86.05%) resultaron estar infectadas por el PepGMV. Es interesante notar que la evidencia genética mostrada aquí, de una baja diversidad genética dentro del PepGMV (particularmente las bajas sustituciones de nucleótidos de la proporción dN/dS en la región del core *Cp*) sugieren fuertemente que una presión selectiva negativa (dN/dS) está operando en la región del gen analizado. Esto es similar a los resultados que se han reportado para el TYLCV (Font *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, casi el 90% de las plantas muestreadas fueron positivas a begomovirus, incluidas las especies parcialmente identificadas del PepGMV, el PHYVV, el ToSLCV, el TYLCV y el EuMV-YP. Predominaron las infecciones simples del PepGMV, que representaron el 82.5% de las clonas secuenciadas. Se observaron infecciones mixtas, incluyendo PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV y PepGMV-ToSLCV en diferentes especies de plantas. Las secuencias parciales proporcionan la identificación provisional de virus aislados en la YPM. La clasificación definitiva y el análisis filogenético requieren secuencias completas de los componentes ADN-A y ADN-B.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a José Luis Tapia por su ayuda con la recolección e identificación de plantas y a Celene Espadas por su asistencia técnica con la generación de mapas.

- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reports 1: 19-21. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02712670.pdf>.
- Duffy S and Holmes EC. 2007. Multiple introductions of the Old World Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the New World. Applied Environmental Microbiology 73: 7114-7117. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-07>.
- Echevarría-Machado I, Sanchez-Cach LA, Hernandez-Zepeda C, Rivera-Madrid R and Moreno-Valenzuela OA. 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. Molecular Biotechnology 31: 129-136. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:129>.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC and Stanley J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. Archives of Virology 148: 405-421. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0957-5>.
- Fauquet CM and Stanley J. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. Archives of Virology 150: 2151-2179. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0583-0>.
- Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB and Zerbini FM. 2006. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. Plant Pathology 55: 513-522. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x>.
- Fiallo-Olive E, Lett JM, Martin D P, Roumagnac P, Varsani A, Murilo-Zerbini F and Navas-Castillo J. 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. Journal of General Virology 102: 1-2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001696>.
- Fiallo-Olive E, Rivera-Bustamante RF and Martínez-Zubiaur Y. 2010. First report of tobacco as a natural host of *Euphorbia mosaic virus* in Cuba. Plant Pathology 59: 795. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02238.x>.
- Font MI, Rubio L, Martínez-Culebras PV and Jordá C. 2007. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. Virus Research 128: 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.04.003>.
- García-Arenal F, Fraile A and Malpica JM. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. International Microbiology 6: 225-232. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0142-z>.
- Garrido-Ramírez ER and Gilbertson RL. 1998. First report of tomato mottle geminivirus infecting tomatoes in Yucatan, Mexico. Plant Disease 82: 592. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.592B>.
- Garzon-Tiznado JA, Acosta-García G, Torres-Pacheco I, González-Chavira M, Rivera-Bustamante RF, Maya-Hernández V y Guevara-González RG. Presencia de los geminivirus huasteco del chile (PHV), texano del chile variante Tamaulipas (TPV-T) y Chino del tomate (CdTV) en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20: 45-52. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61220108.pdf>.
- Godínez-Hernández Y, Anaya-López JL, Díaz-Plaza R, González-Chavira M and Torres-Pacheco I. 2001. Characterization of resistance to Pepper Huasteco Geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. HortScience 36: 139-142. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.1.139>.
- Gregorio-Jorge J, Bernal-Alcocer A, Bañuelos-Hernández B, Alpuche-Solís AG, Hernández-Zepeda C, Moreno-Valenzuela O, Frías-Treviño G and Argüello-Astorga GR. 2010. Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short rep sequences in the DNA-B intergenic region. Virology Journal 7: 275. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-275>.
- Hernández-Espinal LH, Enriquez-Verdugo I, Melgoza-Villagomez CM, Retes-Manjarrez JE, Velarde-Felix S, Linares-Flores PJ y Garzon-Tiznado JA. 2018. Análisis filogenético y distribución de begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. Revista Fitotecnia Mexicana 41: 149-157. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.149-157>.
- Hernández-Verdugo S, Guevara-González RG, Rivera-Bustamante RF and Oyama K. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annum* for resistance to *Pepper huasteco virus* (PHV): presence of viral DNA and differentiation among populations. Euphytica 122: 31-36. <https://doi.org/10.1023/A:1012624830340>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela O. 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: 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 O. 2007b. Molecular characterization and phylogenetic relationships of two new bipartite begomovirus infecting malvaceous plants in Yucatan, Mexico Virus Genes 35: 369-377. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0080-5>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007c. 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: 825-833. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>.
- Jones DR. 2003. Plant Viruses transmitted by whiteflies. European Journal of Plant Pathology 109: 195-219. <https://doi.org/10.1023/A:1022846630513>.
- Lotrakul P, Valverde R A, De La Torre R, Sim J and Gómez A. 2000. Occurrence of a strain of Texas pepper virus in Tabasco and Habanero pepper in Costa Rica. Plant Disease 84: 168-172. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.168>.
- Mendez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM, and Rivera-Bustamante RF. 2003. Interactions Between Geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. Phytopathology 93: 270-277. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.270>.
- Morales-Aguilar JJ, Rodríguez-Negrete EA, Camacho-Beltrán E, López-Luque CA, Leyva-López NE, Jiménez-Díaz F, Voloudakis A, Santos-Cervantes ME and Méndez-Lozano

- J. 2019. Identification of *Tomato yellow leaf curl virus*, *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* associated with pepper diseases in northern Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 41: 544-550. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1591509>.
- Morales F, Hilje L, Vallejos J, Sibaja G, Araya C and Araya R. 2005. Whiteflies as vectors of viruses in legume and vegetable mixed cropping systems in the tropical lowlands of Central America, Mexico and the Caribbean: Costa Rica, 217-221. *In: Whitefly and Whitefly-borne Viruses in the Tropics: Building a Knowledge Base for Global Action*. editors: Anderson P. K. and Morales F. J. CIAT publication No. 34, Cali, CO. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_CIAT/9586940748.pdf.
- Rausch FF, de Albuquerque LC, de Brito GL, Boiteux LS, de Ávila AC and Inoue-Nagata K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0184-y>.
- Polston JE and Anderson PK. 1997. The Emergence of Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81: 1358. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1358>.
- Rodelo-Urrego M, García-Arenal F and Pagan I. 2015. The effect of ecosystem biodiversity on virus genetic diversity depends on virus species: A study of chiltepin-infecting begomoviruses in Mexico. *Virus Evolution* 1:1-13. <https://doi.org/10.1093/ve/vev004>.
- Rodriguez-Negrete EA, Morales-Aguilar JJ, Dominguez-Duran G, Torres-Devora G, Camacho-Beltran E, Leyva-Lopez NE, Voloudakis AE, Bejarano ER and Mendez-Lozano J. 2019. High-throughput sequencing reveals differential begomovirus species diversity in non-cultivated plants in Northern-Pacific Mexico. *Viruses* 11: 594. <https://doi.org/10.3390/v11070594>.
- Seal SE, vandenBosch F and Jeger MJ. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 23-46. <https://doi.org/10.1080/07352680500365257>.
- Tamura K, Stecher G and Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Torres-Herrera SI, Romero-Osorio A, Moreno-Valenzuela O, Pastor-Palacios G, Cardenas-Conejo Y, Ramirez-Prado JH, Riego-Ruiz L, Minero-Garcia Y, Ambriz-Granados S and Argüello-Astorga GR. 2019. A lineage of begomoviruses encode REP and AC4 proteins of enigmatic ancestry: hints on the evolution of geminiviruses in the New World. *Viruses* 11: 644. <https://doi.org/10.3390/v11070644>.
- Torres-Pacheco I, Garzon-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A and Rivera-Bustamante RF. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192. <https://doi.org/10.1094/phyto-86-1186>.
- Villanueva-Alonzo HJ, Us-Camas RY, Lopez-Ochoa LA, Robertson D, Guerra-Peraza O, Minero-Garcia Y and Moreno-Valenzuela OA. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters* 35: 811-823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>.

Biological control perspectives in the pine forest (*Pinus* spp.), an environmentally friendly alternative to the use of pesticides

Perspectivas del control biológico en pinares (*Pinus* spp.), una alternativa ambientalmente viable al uso de plaguicidas

Luis Martín Gutiérrez-Flores, Posgrado en Ciencias Ambientales, ¹Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, C.P. 72570, Puebla, Puebla, México; ¹Lucía López-Reyes, Laboratorio de Microbiología de Suelos; Enrique Hipólito-Romero, Centro de Eco-Alfabetización y Diálogo de Saberes, Universidad Veracruzana, Campus USBI, Col. Emiliano Zapata, Xalapa, Veracruz, México; ¹Eduardo Torres-Ramírez, Laboratorio de Bioinorgánica Aplicada, Centro de Química; ¹Elsa Iracena Castañeda-Roldán, Laboratorio de Patogenicidad Microbiana; ¹Amparo Mauricio-Gutiérrez*.

* Corresponding author: amg2510@hotmail.com

Received: May 26, 2022.

Accepted: August 23, 2022.

Gutiérrez-Flores LM, López-Reyes L, Hipólito-Romero E, Torres-Ramírez E, Castañeda-Roldán EI and Mauricio-Gutiérrez A. 2022. Biological control perspectives in the pine forest (*Pinus* spp.), an environmentally friendly alternative to the use of pesticides. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 401-424.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2205-5>

First DOI publication: August 31, 2022.

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2022.

Abstract. Forests are important for their economic, ecological, and social contribution to humanity. However, there is a decrease in the forest mass due to different causes such as fire, intensive agriculture, overgrazing, air pollution, and the presence of pests and diseases of fungal origin. A practice to deal with diseases caused by fungi has

Resumen. Los bosques son importantes por la contribución económica, ecológica y social a la humanidad. Sin embargo, existe disminución de la masa forestal debido a diferentes causas como el fuego, la agricultura intensiva, sobrepastoreo, contaminación atmosférica y la presencia de plagas y enfermedades de origen fúngico. Una práctica para atender a las enfermedades causadas por hongos ha sido la aplicación de fungicidas de amplio espectro, con consecuencias negativas al ambiente. El control biológico es una alternativa para el manejo de enfermedades en especies de pinos. Debido a la necesidad de conservar la diversidad de especies de pino, en esta revisión se abordan temas relevantes a la importancia de los bosques en el mundo, las enfermedades en *Pinus* spp., el control fúngico por agentes químicos y biológicos, haciendo referencia a diferentes mecanismos de control biológico y los biofungicidas más estudiados como *Trichoderma*

been the application of broad-spectrum, fungicides with negative consequences on the environment. Biological control is an alternative for disease management in pine species. Due to the need to conserve the diversity of pine species, this review addresses issues relevant to the importance of forests in the world, diseases in *Pinus* spp., fungal control by chemical and biological agents, referring to different biological control mechanisms and the most studied biofungicides such as *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. in *Pinus* spp. The various scientific reports on the biological control of fungi in different pine species places it as a promising option in reducing the pathogenicity and incidence of fungal diseases with less negative effects on the environment than synthetic pesticides of chemical origin. Therefore, this review aims to transmit information on biological control in pine trees as a friendly alternative for the recovery of forests.

Keywords: Forest health, biocontrol, conservation, fungal diseases.

Forests are natural assets with high environmental value due to their contribution to ecosystems and society. They provide raw materials such as wood and products for food medicine, and fuel. They also provide ecosystem services such as soil erosion protection, oxygen generation, carbon sequestration, regulation of global climatic conditions and biodiversity preservation (FAO, 2011; FAO, 2018). Furthermore, 75% of the freshwater available on the planet comes from hydrographic basins associated with forests (Springgay, 2019). In addition, agroforestry activities provide recreational and tourist activities that can be turned into a source of income (Balvanera, 2012; Brown and Verschuuren, 2018).

An estimated 1000 million people throughout the world depend on forest ecosystems for their

sp. y *Bacillus* sp. en *Pinus* spp. Los diversos reportes científicos sobre el control biológico de hongos en diferentes especies de pino, lo coloca como una opción prometedora en la disminución de la patogenicidad e incidencia de las enfermedades fúngicas con menos efectos negativos al ambiente como lo hacen los plaguicidas sintéticos de origen químico. Por lo que, esta revisión tiene como objetivo difundir información sobre el control biológico en plantas de pino como una alternativa amigable para la recuperación de los bosques.

Palabras clave: Sanidad forestal, biocontrol, conservación, enfermedades fúngicas.

Los bosques son bienes naturales de alto valor ambiental por su aporte a los ecosistemas y a la sociedad, al proveer materias primas como madera y productos para alimentos, medicamentos, dendroenergía; además de servicios ecosistémicos como protección de la erosión del suelo, generación de oxígeno, sumidero de carbono, regulación de condiciones climáticas del planeta y preservación de la biodiversidad (FAO, 2011; FAO, 2018). Por otro lado, el 75% del agua dulce disponible en el planeta, proviene de cuencas hidrográficas asociadas a los bosques (Springgay, 2019). Adicionalmente, las actividades agroforestales proporcionan espacios recreativos y turísticos como una fuente de ingresos (Balvanera, 2012; Brown y Verschuuren, 2018).

Se calcula que alrededor de 1000 millones de personas en el mundo, dependen de estos ecosistemas para su subsistencia como fuente directa o indirecta al proporcionar más de 580 000 millones de dólares al año de ingresos laborables, y 8000 millones de dólares de productos forestales no maderables (FAO, 2018; FAO y UNEP, 2020). Sin embargo, debido al uso intensivo y no sustentable de los bosques existe disminución forestal ocasionada

subsistence as a direct or indirect source of income. Forests provide more than 580 000 million dollars a year of labor income, as well as 8000 million dollars of non-timber forest products (FAO, 2018; FAO and UNEP, 2020). However, the intensive and unsustainable use of forests, which is associated with fires, intensive agriculture, overgrazing, atmospheric pollution, and the presence of pests and diseases, has caused them to decline (Ken *et al.*, 2020).

In Mexico, despite the efforts made by the forestry sector, only a low proportion of the forested area is subjected to diagnosis and timely detection of pests and diseases. Pesticides, which are applied indiscriminately to keep the phytosanitary conditions below the economic threshold, are another great cause of adverse effects. Most of these products are highly toxic chemical formulations that should be used under pest incidence monitoring and integrated forest systems to avoid affecting the balance of ecosystems. The use of new technologies, such as biological control agents, that are safer and more effective than traditional methods of pest control should be more widely promoted. Until now, these technologies have been little used by the forestry sector (Villacide and Corley, 2012; Flores-Villegas *et al.*, 2019). The present work is a review of the current knowledge on the phytopathogenic agents associated with the main forestry diseases and the biological control agents that have been used to control them.

Diseases of *Pinus* spp. Pine Forest diseases are alterations of forest health associated with the interaction between pathogens, susceptible trees, and a favorable environment. Fungal diseases are one of the main causes of the decrease in forest biomass in Mexico (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020). The presence of diseased *Pinus* spp. trees favors

por explotaciones indiscriminadas y condiciones adversas como el fuego, agricultura intensiva, sobrepastoreo, contaminación atmosférica, y presencia de plagas y enfermedades (Ken *et al.*, 2020).

En el caso de México, a pesar de los esfuerzos realizados por el sector forestal, existe una baja proporción de la superficie arbolada sujeta al diagnóstico y detección oportuna de las plagas y enfermedades, en comparación con la superficie establecida. Otro de los efectos adversos son los plaguicidas, al aplicarse de forma indiscriminada con el esfuerzo de mantener el estatus fitosanitario por debajo del umbral económico. Además, estos productos en su mayoría son formulaciones químicas de alta toxicidad y su uso debe de integrarse bajo un monitoreo de incidencia de plagas e implementar un manejo integrado de la población forestal que permita su conservación sin afectar el equilibrio de los ecosistemas. Aunado a ello, la implementación de nuevas tecnologías seguras y efectivas que los métodos tradicionales, como es el uso de agentes de control biológico de enfermedades debe de implementarse a mayor escala, ya que esta área ha sido poco abordada en el sector forestal (Villacide y Corley, 2012; Flores-Villegas *et al.*, 2019). Es por ello, el interés de esta revisión, conocer los agentes fitopatógenos asociados a las principales enfermedades en los forestales y los agentes de control biológico que se han implementado para el control de las mismas.

Enfermedades en *Pinus* spp. Las enfermedades en bosques de pino, son alteraciones a la salud forestal asociadas a la interacción de un patógeno, un árbol susceptible y ambiente favorable. Las enfermedades fúngicas son una de las causas principales de la disminución de la biomasa boscosa en México (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020). La presencia de árboles de *Pinus* spp. enfermos favorece la diseminación del patógeno en el ecosistema, a través

the dissemination of pathogens in the ecosystem through natural and anthropic factors (Figure 1). Phytopathogenic fungi attack different parts of pine trees, causing various diseases (Belén *et al.*, 2011). In *Pinus patula*, for example, fungal infection causes the needles to fall. The damage starts from the needles and spreads to the branches, stems and sometimes even the roots, causing the tree to die and the forest population to decrease (Figure 2). This disease is mainly associated with pathogens such as *Alternaria alternata* and *Meria laricis*, but there are also reports of its association with the genera *Annulohypoxyton*, *Botryosphaeria*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Diplodia*, *Lophodermium*, and *Myrmaecium* in different pine species such as *P. arizonica*, *P. cembroides*, *P. patula*, and *P. pseudostrobus* from different places such throughout the world as Canada, China, USA, and Mexico, among others (Table 1) (Guo *et al.*, 2008;

de factores naturales y antrópicos (Figura 1). Los hongos fitopatógenos atacan diferentes partes de los árboles de pino ocasionando varias enfermedades (Belén *et al.*, 2011). Por ejemplo, en *Pinus patula* ha causado la caída de acículas, el daño inicia desde las acículas extendiéndose a ramas, tallos y en ocasiones hasta la raíz, generando la muerte del árbol lo que provoca una disminución de la población forestal (Figura 2). Esta enfermedad está asociada a patógenos como *Alternaria alternata* y *Meria laricis* principalmente, también se señalan a los géneros de *Annulohypoxyton*, *Botryosphaeria*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Diplodia*, *Lophodermium* y *Myrmaecium* en distintas especies de pino como *P. arizonica*, *P. cembroides*, *P. patula*, y *P. pseudostrobus* de diferentes sitios como Canadá, China, EUA, México, entre otros (Cuadro 1) (Guo *et al.*, 2008; Cram *et al.*, 2012; Marmolejo-Monciváis, 2018; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020). La disponibilidad

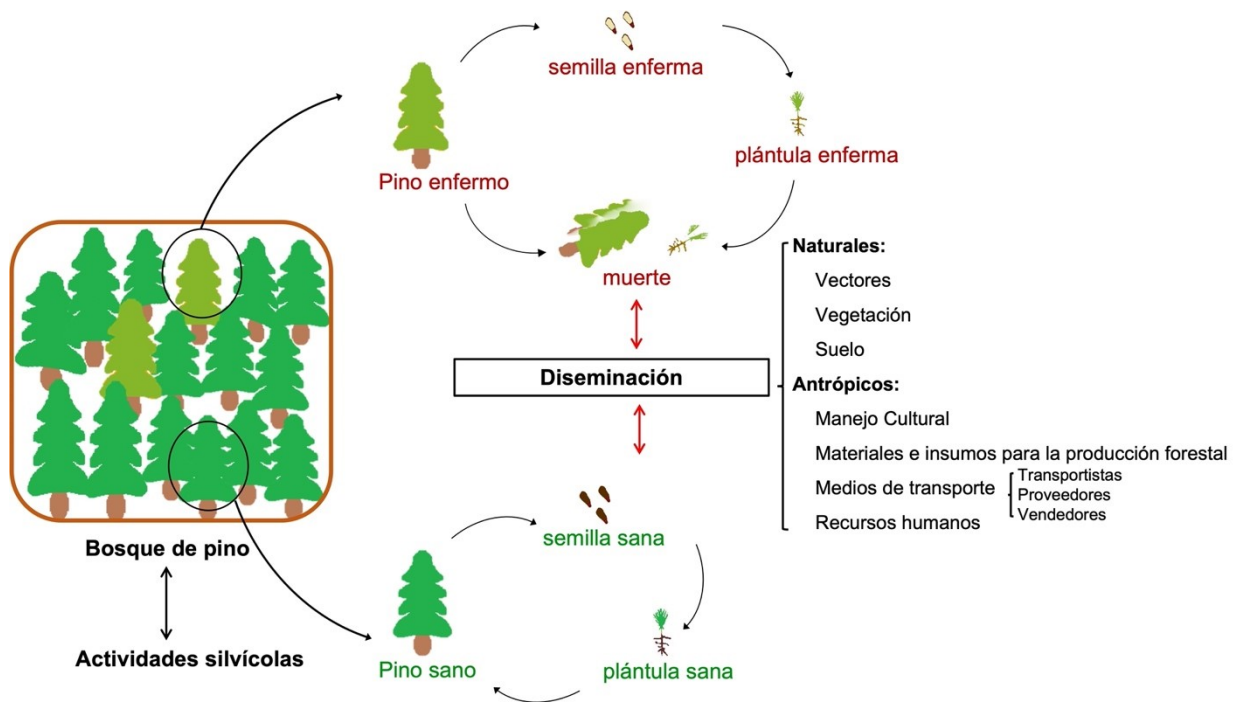


Figure 1. Dissemination of pathogens associated with diseases in pine forest.
 Figura 1. Forma de diseminación de patógenos asociados a enfermedades en bosque de pino.

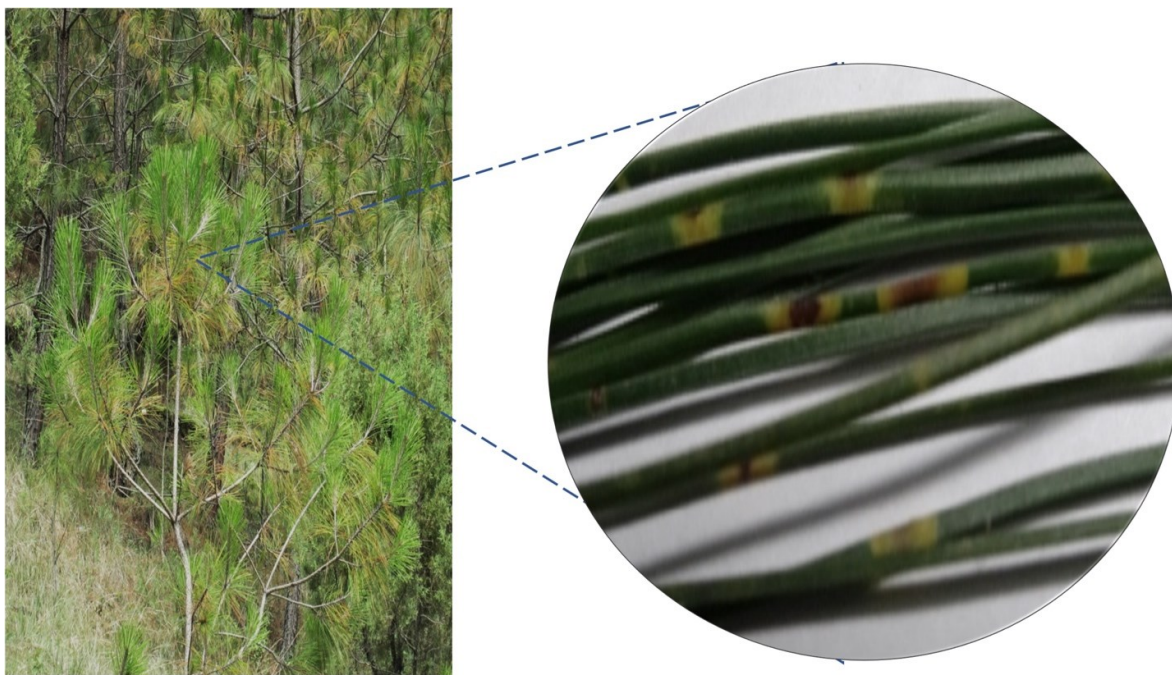


Figure 2. Symptoms associated with phytopathogenic fungi. The symptoms observed in *Pinus patula* trees are foliage yellowing, needle drop, yellow lesions and central wood necrosis.

Figura 2. Síntomas asociados a hongos fitopatógenos. Los síntomas se observan en amarillamiento del follaje, caída de acículas y lesiones de color amarillo y en el centro necrosis en árboles de *Pinus patula*.

Cram *et al.*, 2012; Marmolejo-Monciváis, 2018; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020). The availability of nutrients in the soil also contributes to needle drop (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020).

Diplodia sapinea is an opportunistic pathogen with a worldwide distribution that mainly affects *P. patula* and *P. sylvestris*. It has been associated with dieback, a disease in which diseased needles initially turn yellow, then red, brown or gray, and branch deformation results in needle death, with cankers on stems, branches and buds (Ospina *et al.*, 2011; Cram *et al.*, 2012; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Larsson *et al.*, 2021). Other pathogens such as *Fusarium circinatum* cause pine pitch canker, in which the needles wither and change from yellow to reddish until dry, and the shoots are defoliated,

de nutrientes en el suelo también contribuyen a la caída de acículas (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020).

Por otro lado, *Diplodia sapinea* es un patógeno oportunista de distribución mundial que afecta principalmente a *P. patula* y *P. sylvestris*; y ha sido asociado a la muerte descendente en donde las acículas enfermas al inicio tienen una apariencia de color amarillo, luego de rojo a marrón o gris, con deformación de ramas dando como resultado de la muerte de la acícula, chancros en tallos, ramas y yemas (Ospina *et al.*, 2011; Cram *et al.*, 2012; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Larsson *et al.*, 2021). Otros patógenos como *Fusarium circinatum* ocasiona el chancro resinoso del pino, donde las acículas se marchitan y cambian de color amarillo a rojizo hasta secarse, y quedar los brotes defoliados

Table 1. Fungi reported national and internationally that are associated with the main diseases present in *Pinus* spp.
Cuadro 1. Hongos reportados nacional e internacionalmente que se asocian con las principales enfermedades presentes en especies de *Pinus* spp.

| Patógeno fúngico | Enfermedad | Hospedante | Distribución | Referencia |
|---|---|---|---|---|
| <i>Alternaria alternata</i> | Caída de acículas | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. arizonica</i>
<i>P. cembroides</i>
<i>P. patula</i>
<i>P. pseudostrobus</i> | China
México | Guo <i>et al.</i> , 2008
Marmolejo-Monciváis, 2018
Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Annulohyphoxylon stygium</i> | Caída de acículas | <i>P. patula</i> | México | Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | Moho Gris | <i>P. massoniana</i> | Suecia | Capieau <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> | Caída de acículas
Muerte regresiva | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. patula</i>
<i>P. patula</i> | México
Sudáfrica | Marsberg <i>et al.</i> 2017
Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Ceratocystis</i> sp. | Mancha azul en trozas | <i>P. patula</i>
<i>P. radiata</i>
<i>P. tropicalis</i> | Colombia | Guerra <i>et al.</i> , 2004
Osorio, 2007
Ospina <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Cronartium quercuum</i> | Roya de agallas | <i>Pinus</i> sp. | EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Cronartium quercuum</i>
f. sp. <i>fusiforme</i> | Oxidación fusiforme | <i>Pinus</i> sp. | EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Curvularia</i> sp.
<i>C. lunata</i>
<i>C. pseudobrachyspora</i>
<i>C. spicifera</i>
<i>C. trifolii</i> | Caída de acículas | <i>P. patula</i> | México | Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Cylindrocarpon</i> sp. | Pie negro | <i>Pinus</i> sp. | EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Daldinia</i> sp.
<i>D. eschscholtzii</i>
<i>D. fissa</i>
<i>D. petriniae</i> | Caída de acículas
Chancrosis | <i>P. patula</i>
<i>P. sylvestris</i> | España
México | Stadler <i>et al.</i> 2014
Sanz-Ros <i>et al.</i> 2015
Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Diplodia sapinea</i> | Caída de acículas
Muerte descendente | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. patula</i>
<i>P. sylvestris</i> | Colombia
EUA
México
Suecia | Ospina <i>et al.</i> , 2011
Cram <i>et al.</i> , 2012
Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020
Larsson <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Dothistroma</i> sp. | Banda roja | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. contorta</i>
<i>P. ponderosa</i>
<i>P. nigra</i>
<i>P. radiata</i> | México
Suiza | Cibrían, 2007
Cram <i>et al.</i> , 2012
Queloz <i>et al.</i> , 2014
Alenezi <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Fusarium</i> sp.
<i>F. oxysporum</i>
<i>F. solani</i> | Fusariosis vascular | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. patula</i>
<i>P. pseudostrobus</i> | Colombia
México | Ospina <i>et al.</i> , 2011
Robles-Yerena <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>F. circinatum</i> | Chancro resinoso del pino | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. greggii</i>
<i>P. massoniana</i>
<i>P. nigra</i>
<i>P. pinaster</i>
<i>P. pinea</i>
<i>P. radiata</i>
<i>P. sylvestris</i>
<i>P. taeda</i> | Chile
China
EUA
España
México | Cram <i>et al.</i> , 2012
Carrasco <i>et al.</i> , 2016
Martínez-Álvarez <i>et al.</i> , 2016
Flores-Pacheco, 2017
Iturrutxa <i>et al.</i> , 2017
García-Díaz <i>et al.</i> , 2019
Yu y Luo, 2020 |

Table 1. Continue.
Cuadro 1. Continúa.

| Patógeno fúngico | Enfermedad | Hospedante | Distribución | Referencia |
|--|------------------------------------|--|---|---|
| <i>Lecanosticta acicola</i> | Banda marrón | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. mugo</i>
<i>P. sylvestris</i> | Guatemala
México
Polonia
Turquía | van der Nest <i>et al.</i> , 2019
Oskay <i>et al.</i> , 2020
Raitelaityté <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Lophodermium</i> sp.
<i>L. indianum</i>
<i>L. seditiosum</i> | Caída de acículas
Chancrosis | <i>P. ayacahuite</i>
<i>P. montezumae</i>
<i>P. patula</i>
<i>P. sylvestris</i> | Escocia
México
Polonia
Rusia | Reignoux <i>et al.</i> 2014
Behnke-Borowczyk <i>et al.</i> , 2018
Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020
Sheller <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Meria laricis</i> | Caída de acículas | <i>Pinus</i> sp. | Cánada
EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Mycosphaerella</i> sp. | Banda roja de la acícula | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. patula</i> | Colombia
EUA | Ospina <i>et al.</i> , 2011
Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Myrmaecium rubricosum</i> | Caída de acículas | <i>P. patula</i> | México | Gutiérrez-Flores <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Passalora sequoiae</i> | Moho de la hoja | <i>Pinus</i> sp. | EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Pestalotiopsis funerea</i> | Tizón del follaje | <i>Pinus</i> sp. | EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Phoma eupyrena</i> | Phomosis | <i>Pinus</i> sp. | EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Phomopsis juniperovora</i>
<i>P. lokoyae</i> | Phomosis | <i>Pinus</i> sp. | EUA | Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Phytophthora cinnamomi</i> | Muerte de raíces | <i>P. radiata</i> | Chile | Ahumada <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Phytophthora</i> sp.
<i>Pythium</i> sp.
<i>Rhizoctonia</i> sp. | Volcamiento o pudrición de la raíz | <i>Pinus</i> sp.
<i>P. patula</i> | Colombia
EUA | Ospina <i>et al.</i> , 2011
Cram <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Ophiostoma</i> sp.
<i>O. pulvinisporum</i>
<i>O. pluriannulatum</i> | Mancha azul de la madera | <i>P. leiophylla</i>
<i>P. teocote</i> | México | Moreno-Rico <i>et al.</i> , 2015 |

frequently causing crown dieback and eventually leading to the death of the tree. This pathogen is widely distributed in various countries, including Mexico. Therefore, it affects a wide variety of pine species (Cram *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2016; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016; Flores-Pacheco, 2017; Iturrutxa *et al.*, 2017; García-Díaz *et al.*, 2019; Yu and Luo, 2020). The genus *Lophodermium* is present in forests of Mexico, Europe and Asia. It has been associated with the species *Pinus ayacahuite*, *P. patula*, *Pinus montezumae*, and *P. sylvestris*. Infected needles develop brown spots with yellow margins, ending with tissue death (Cibrián *et al.*, 2007; Reignoux *et al.*, 2014;

con la probabilidad de estrangular el ápice de crecimiento y muerte del árbol; este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en diversos países incluido México por lo que afecta a una gran variedad de especies de pinos (Cram *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2016; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016; Flores-Pacheco, 2017; Iturrutxa *et al.*, 2017; García-Díaz *et al.*, 2019; Yu y Luo, 2020). El género *Lophodermium* está presente en bosques de México, Europa y Asia; y se ha asociado a las especies de *Pinus ayacahuite*, *P. patula*, *Pinus montezumae*, y *P. sylvestris*; donde las acículas infectadas desarrollan manchas pardas con márgenes amarillos, finalizando con la muerte del tejido (Cibrián *et al.*,

Behnke-Borowczyk *et al.*, 2018; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Sheller *et al.*, 2020). Other fungal genera that have been reported to affect *Pinus* spp. are *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Cylindrocarpon*, *Cronartium*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Dothistroma*, *Mycosphaerella*, *Lecanosticta*, *Phytophthora*, *Pythium*, and *Rhizoctonia* (Figure 3). These fungi trigger different pathologies such as gray mold, regressive death, blue spot, blackfoot, blight, etc. (Table 1) (Ospina *et al.*, 2011; Cram *et al.*, 2012; Moreno-Rico *et al.*, 2015; van der Nest *et al.*, 2019; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Oskay *et al.*, 2020; Raitelaityté *et al.*, 2020).

The phytopathogenic fungi associated with *Pinus* spp. are difficult to identify, due to the relationship between their life cycles, the phenological development of the host, and the presence of environmental factors that makes them behave as saprophytes and mutualists (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020). The great diversity of fungal agents that cause foliar loss and death in *Pinus* spp. throughout the world has elicited concern and interest among the scientific community and society in general (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Larsson *et al.*, 2021). This phytosanitary situation has driven the search for ways to manage and control diseases of fungal origin using synthetic molecules and biological agents (Adusei-Fosu and Rolando, 2018; Kang *et al.*, 2019).

Importance of pesticides. Pesticides are anthropogenic substances or mixtures of substances with broad-spectrum activity and environmental persistence that are intended to prevent, destroy or control crop pests (Narváez-Valderrama *et al.*, 2012; del Puerto-Rodríguez *et al.*, 2014). The dispersion of pesticide chemicals among plants depends on the physicochemical properties of pesticides, their formulation and presentation, climatic conditions, geological characteristics, forms of application

2007; Reignoux *et al.* 2014; Behnke-Borowczyk *et al.*, 2018; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Sheller *et al.*, 2020). Otros géneros que se han reportado han sido *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Cylindrocarpon*, *Cronartium*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Dothistroma*, *Mycosphaerella*, *Lecanosticta*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia* asociados a *Pinus* spp., (Figura 3) donde desencadenan diferentes patologías como moho gris, muerte regresiva, mancha azul, pie negro, tizones, etc. (Cuadro 1) (Ospina *et al.*, 2011; Cram *et al.*, 2012; Moreno-Rico *et al.*, 2015; van der Nest *et al.*, 2019; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Oskay *et al.*, 2020; Raitelaityté *et al.*, 2020).

Los hongos fitopatógenos asociados a *Pinus* spp. son difíciles de identificar, debido a la interrelación entre sus ciclos de vida, el desarrollo fenológico del hospedero, y los factores ambientales; hace que se comporten como saprófitos y mutualistas (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020). Lo que ha originado preocupación e interés de la comunidad científica y la sociedad, sobre la gran diversidad de agentes fúngicos que causan la pérdida foliar, y muerte de árboles de *Pinus* spp. en los continentes Africano, Americano, Asiático y Europeo (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020; Larsson *et al.*, 2021); ante esta situación fitosanitaria se ha indagado sobre el manejo y control de enfermedades de origen fúngico a base de moléculas sintéticas de origen químico y agentes de origen vivo (Adusei-Fosu y Rolando, 2018; Kang *et al.*, 2019).

Importancia de los plaguicidas. Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias antrópicas destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, con medios de acción de amplio espectro y que comúnmente son persistentes en el ambiente (Narváez-Valderrama *et al.*, 2012; del Puerto-Rodríguez *et al.*, 2014). Su dispersión de los químicos en la planta depende de sus propiedades fisicoquímicas, las condiciones climáticas, las características

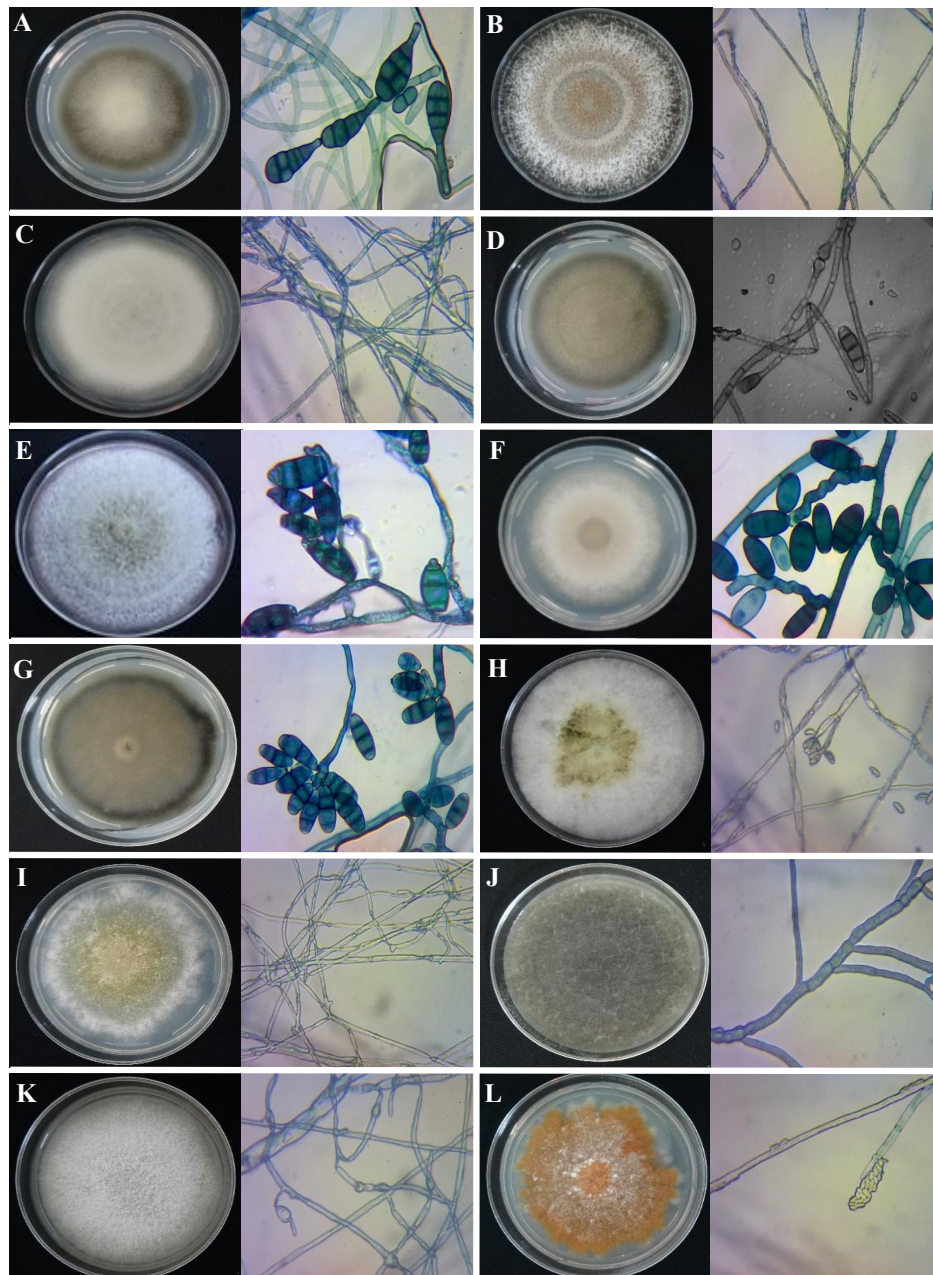


Figure 3. Most frequent fungi associated with *Pinus patula* de Tetela de Ocampo, Puebla, México. A. *Alternaria alternata* M1AAR1; B. *Annulohyphoxylon stygium* T1R1; C. *Botryosphaeria dothidea* M7MtPpA-CH3 (2); D. *Curvularia lunata* M1MtPpA-AA; E. *C. pseudobrachyspora* M41MtPpA-CHR1; F. *C. spicifera* M21MtPpA-AAR2; G. *C. trifolii* M2MtPpA-AA; H. *Daldinia eschscholtzii* T5R2; I. *Daldinia* sp. M3MtPpA-CHR2 (2); J. *Diplodia sapinea* M3MtPpA-CH; K. *Lophodermium indianum* M1MtPpA-PDAR1; and L. *Myrmaecium rubricosum* M1MtPpA-PDA (Modified by Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020).

Figura 3. Hongos más frecuentes asociados a *Pinus patula* de Tetela de Ocampo, Puebla, México. A. *Alternaria alternata* M1AAR1; B. *Annulohyphoxylon stygium* T1R1; C. *Botryosphaeria dothidea* M7MtPpA-CH3 (2); D. *Curvularia lunata* M1MtPpA-AA; E. *C. pseudobrachyspora* M41MtPpA-CHR1; F. *C. spicifera* M21MtPpA-AAR2; G. *C. trifolii* M2MtPpA-AA; H. *Daldinia eschscholtzii* T5R2; I. *Daldinia* sp. M3MtPpA-CHR2 (2); J. *Diplodia sapinea* M3MtPpA-CH; K. *Lophodermium indianum* M1MtPpA-PDAR1; y L. *Myrmaecium rubricosum* M1MtPpA-PDA (Modificado de Gutiérrez-Flores *et al.*, 2020).

and transport processes (Ramírez and Lacasaña, 2001). Pesticides can be classified according to their use as insecticides, fungicides, herbicides, bactericides, etc.; They are also classified based on their chemical composition into organochlorines, organophosphates, carbamates, pyrethroids, bipyrindyl compounds, inorganic salts, etc (Ferrer, 2003; Serra *et al.*, 2020). The excessive and irrational use of these chemical products is an important problem not only because their residual persistence in the environment and the resistance that pest organisms can generate against them, but also because they can get into human bodies through drinking water, air, soil, and indirectly, through the biological chain of food. This can cause several health problems, including genetic mutations, hormonal alterations and endocrine modifications (Tobón-Marulanda *et al.*, 2010; Ortíz *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2020).

Fungal control by chemical agents. Fungicides have been widely used to control fungi and are classified according to their characteristics, including their chemical or biological origin. Chemical fungicides have been applied as foliar sprays to control phytopathogenic fungi in forest species. In Mexico, fungicides used in forestry have also been used in agriculture. These include Azoxystrobin, Chlorothalonil, Fosetil-Al, Calcium Phosphite, Copper Phosphite, Potassium Phosphite, Mancozeb, Metalaxyl-Chlorothalonil, and Propiconazole (Table 2). These function as residual or contact protectants that control or prevent the spread of fungi to healthy hosts when applied correctly (Adusei-Fosu and Rolando, 2018). Table 2 lists some fungicides with systemic action, Azoxystrobin (strobilurins), Fosetil-Al (organophosphate), Metalaxil (acylalanines), and Propiconazole (triazoles), as well as fungicides with protective and healing activity, Chlorothalonil

geológicas, de la formulación y presentación del producto, formas de aplicación y procesos de transporte (Ramírez y Lacasaña, 2001). Los plaguicidas, pueden clasificarse en función de su empleo como insecticidas, fungicidas, herbicidas, bactericidas, etc.; también se clasifican con base a su composición química en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, compuestos bipiridílicos, sales inorgánicas, entre otros (Ferrer, 2003; Serra *et al.*, 2020). La importancia del uso excesivo e irracional de estos productos químicos, no solo radica en la residualidad de estos en el medio ambiente, resistencia que puede generar en las plagas, sino, también porque puede llegar al hombre directamente a través del agua potable, aire, suelo, e indirectamente, a través de la cadena biológica de los alimentos con expresión de daños a la salud de la población, como mutaciones genéticas, alteraciones hormonales y modificaciones endócrinas (Tobón-Marulanda *et al.*, 2010; Ortíz *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2020).

Control fúngico por sustancias químicas. Los fungicidas se han utilizado ampliamente para el control de hongos, y son clasificados de acuerdo a las características de los productos, entre ellos, por su naturaleza como químicos y biológicos. Para el control de hongos fitopatógenos en especies forestales, se han aplicado fungicidas químicos como aerosoles foliares. En México, los fungicidas que utilizan para los forestales también se encuentran documentados para uso agrícola como el Azoxystrobin, Clorotalonil, Fosetil-Al, Fosfito de Calcio, Fosfito de Cobre, Fosfito de Potasio, Mancozeb, Metalaxil-Clorotalonil y Propiconazol (Cuadro 2). Estos funcionan como protectantes, residuales o de contacto para controlar o prevenir la propagación de los hongos a hospederos sanos y proteger contra nuevas infecciones si su aplicación es correcta (Adusei-Fosu y Rolando, 2018). En el Cuadro 2 se

**Table 2. Main chemical fungicides recommended for forestry use in Mexico.
Cuadro 2. Principales fungicidas químicos recomendados para uso forestal en México.**

| Ingrediente activo:
concentración (%) | Actividad ^z | Grupo
químico | Intervalo entre
aplicaciones
(días) | Dosis para
uso forestal
en 100 L |
|--|--|--------------------------------|---|--|
| Azoxystrobin: (23) | Sistémico, protector y curativo | Estrobilurinas | 7-14 | 0.20-0.40 L |
| Clorotalonil: (52-54) | Protector y curativo | Cloronitrilos | 7-10 | 1.75-2.6 L |
| Fosetil-Al: (80) | Sistémico | Organofosforados | 10-14 | 200-300 g |
| Fosfito de calcio: (25) | Inductor de defensa, y aporta nutrientes | Oxisal | 7-14 | 0.25 L |
| Fosfito de cobre: (40) | Inductor de defensa, y aporta nutrientes | Oxisal | 20-25 | 0.25 L |
| Fosfito potásico: (70) | Inductor de defensa, y aporta nutrientes | Oxisal | 7-10 | 0.250 L |
| Mancozeb: (30-80) | Protector no sistémico | Ditiocarbamatos | 7-10 | 250-300 g |
| Metalaxil: (9),
Clorotalonil: (72) | Sistémico, protector y curativo | Acilalaninas,
Cloronitrilos | 10-14 | 400-1000 g |
| Propiconazol: (26) | Sistémico, protector y curativo | Triazoles | 7-10 | 0.5 L |

^zDictionary of Agrochemical Specialties (DEAQ, 2022); Federal Commission for the Protection against Sanitary Risks. / ^zDiccionario de Especialidades Agroquímicas (DEAQ, 2022); Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, 2019).

(chloronitriles), and Mancozeb (dithiocarbamates), that must be applied before the fungal infection to prevent the development of new lesions (DEAQ, 2022). It is important to know which fungi affect forest trees because there are many tree diseases that are natural (old age) and cyclical ecological phenomena, and most of them are untreatable with fungicides (Adusei-Fosu and Roland, 2018).

Fungicides are classified as highly dangerous since they can cause harmful effects in humans such as contact dermatitis, chronic skin diseases, visual disturbances, and pulmonary edema, sometimes with lethal consequences. This is often the result of not complying with the criteria established by the United Nations Organization (UN) for the use and commercialization of fungicides (Speck-Planche *et al.*, 2012; FAO and WHO, 2016). Some fungicides authorized for use in Mexico by the Federal Commission for the Protection against Sanitary Risks (COFEPRIS) include Azoxystrobin, Chlorothalonil, Fosetil-Al, Mancozeb, Metalaxyl-Chlorothalonil, and Propiconazole (COFEPRIS, 2019). However, Chlorothalonil is on the list of

mencionan algunos fungicidas que actúan de forma sistémica: Azoxystrobin (estrobilurinas), Fosetil-Al (organofosforado), Metalaxil (acilalaninas) y Propiconazol (triazoles); o bien que actúan como fungicidas de protección y curación: Clorotalonil (cloronitrilos) y Mancozeb (ditiocarbamatos) que deben aplicarse antes de la infección fúngica para evitar el desarrollo de nuevas lesiones (DEAQ, 2022). Por otro lado, es importante conocer los hongos asociados a los forestales, ya que existen muchas enfermedades de los árboles como fenómenos ecológicos naturales (vejez en árboles) y cíclicos, y en su mayoría son intratables con el uso de fungicidas (Adusei-Fosu y Rolando, 2018).

Los fungicidas están clasificados como altamente peligrosos y pueden causar afectaciones en el ser humano como dermatitis de contacto, enfermedades crónicas de la piel, alteraciones visuales, edema pulmonar y daño letal; esto al no cumplir con los criterios establecidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para su uso y comercialización (Speck-Planche *et al.*, 2012; FAO y WHO, 2016). Algunos se encuentran autorizados

extremely dangerous substances for human health (NJ Health, 2017) due to its carcinogenic properties and the fact that it is highly toxic to fauna, posing a serious environmental risk (Reglinski and Dick, 2005; Ortíz *et al.*, 2014).

Unfortunately, there is a lack of information about the characterization and effective use of chemical fungicides in pine trees. Not enough is known about the physiological, biochemical and molecular modes of action of these products, the procedures that should be followed to avoid the development of resistance to chemical molecules in disease-causing agents, their effects on the soil microbiota, the application dose, or the time, place and methods with which to apply them (Adusei-Fosu and Rolando, 2018).

Fungal control by biological agents. Biological fungicides, also known as biofungicides (Heydari and Pessaraki, 2010; Liu *et al.*, 2021) or biocontrol agents, are formulations developed from bacteria or fungi that are designed to control and/or eradicate pathogenic fungi. These products have been used as an alternative method to reduce the damage caused by pathogenic fungi while generating little or no environmental contamination and without generating resistance in the targeted fungi (Guédez *et al.*, 2008; Heydari and Pessaraki, 2010).

The biological control of fungi and also involve the participation of an antagonist organism, an agent or a combination of biological agents that can interfere with the physiological processes of pathogenic parasites (Legrand *et al.*, 2017). The efficient use of biological control agents affects various interactions between the biological control agent, the pathogen, the host, and the environment, among others. It can be effective in reducing the incidence of pathogenic fungi among forest populations (Figure 4).

por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) como: Azoxystrobin, Clorotalonil, Fosetil-Al, Mancozeb, Metalaxil-Clorotalonil y Propiconazol (COFEPRIS, 2019). Sin embargo, el Clorotalonil se encuentra en la lista de sustancias extremadamente peligrosas para la salud (NJ Health, 2017) ya que es carcinógeno, y de alta toxicidad para la fauna por lo que representa un riesgo ambiental (Reglinski y Dick, 2005; Ortíz *et al.*, 2014).

Desafortunadamente se carece de suficiente información sobre la identificación y el uso efectivo de los fungicidas químicos en árboles de pino. Entre estos, los modos de acción fisiológico, bioquímico y molecular; así como los mecanismos para evitar el desarrollo de resistencia en los agentes causantes de enfermedades a las moléculas químicas, efectos sobre la microbiota del suelo, dosis de aplicación, tiempo, lugar y métodos de aplicación de los fungicidas (Adusei-Fosu y Rolando, 2018).

Control fúngico por agentes biológicos. Por otra parte, los fungicidas biológicos son formulaciones desarrolladas a partir de bacterias u hongos, destinados al control y/o erradicación de hongos patógenos, conocidos también como biofungicidas (Heydari y Pessaraki, 2010; Liu *et al.*, 2021), o agentes de biocontrol. Estos productos se han utilizado como una alternativa para disminuir los daños causantes por patógenos, con bajos o nulos problemas de contaminación ambiental y de generar resistencia en los hongos (Guédez *et al.*, 2008; Heydari y Pessaraki, 2010).

En el control biológico de hongos interviene otro organismo llamado antagonista, el cual es un agente o mezcla de agentes biológicos, con potencial para interferir en cualquiera de los procesos vitales fisiológicos del parasitismo de los patógenos (Legrand *et al.*, 2017). La eficiencia del uso

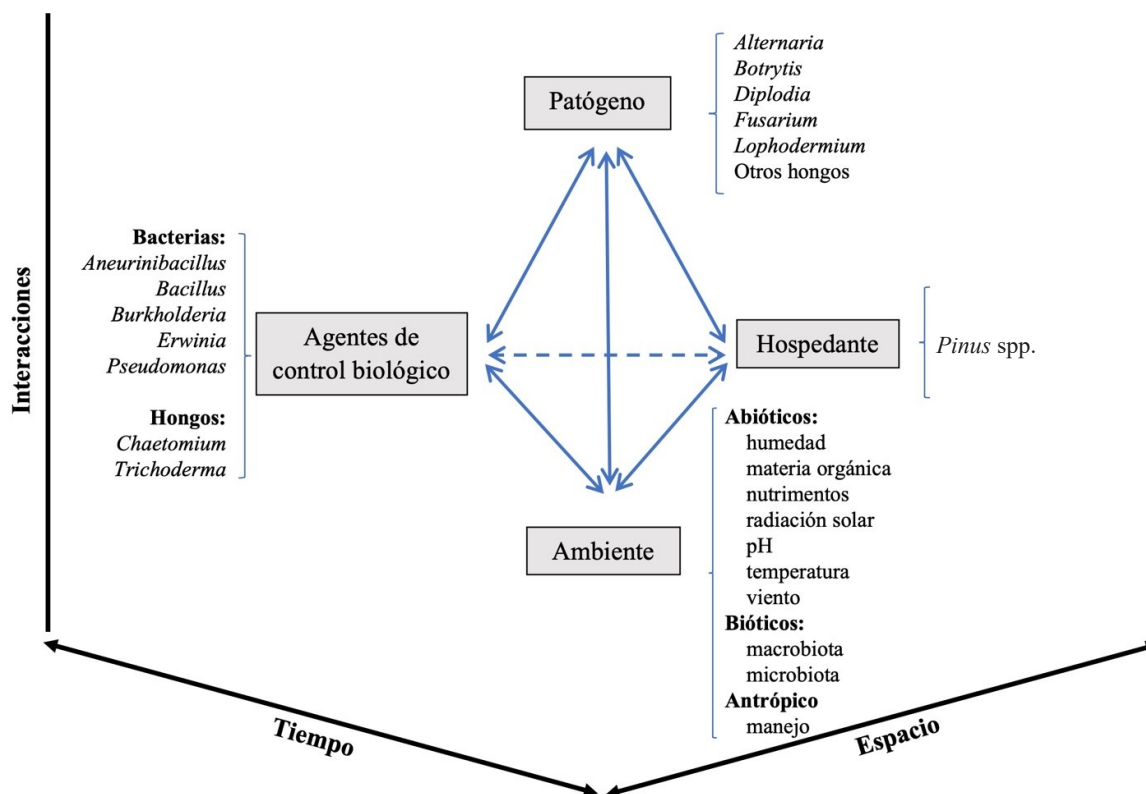


Figure 4. Interactions that play a role in biological control (Adaptado de Mora-Aguilera *et al.*, 2017).
Figura 4. Interacciones involucradas en el control biológico (Adaptado de Mora-Aguilera *et al.*, 2017).

The interest in biological control has increased in recent decades due to its advantages over traditional fungal control methods (Table 3), mainly due to the indiscriminate use of chemical products, which has led pathogens to develop resistance (Gepp *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019). The increasing commitment to environmental conservation has promoted the development of sustainable and comprehensive methods to reduce the excessive use of agrochemicals. Biological control agents have shown to be effective in reducing the inoculum load of the pathogen. Antagonist organisms are involved in different mechanisms that may act together against pathogens, such as competition for space and nutrients, parasitism, production of secondary metabolites (antibiotics, lytic enzymes and volatile

de agentes de control biológico involucra diversas interacciones basadas en el sistema epidemiológico entre el agente de control biológico, patógeno, hospedante, ambiente, entre otros; y en consecuencia puede ser efectivo al reducir la incidencia del hongo en una población forestal (Figura 4).

El interés por el control biológico ha aumentado en las últimas décadas por las ventajas que tiene sobre los métodos tradicionales (Cuadro 3); debido principalmente a que el uso indiscriminado de productos químicos ha ocasionado resistencia a los patógenos (Gepp *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019). Actualmente, existe un mayor compromiso por la conservación del ambiente lo que ha promovido el desarrollo de prácticas sustentables e integrales con el fin de reducir el uso excesivo de los agroquímicos.

Table 3. Advantages and disadvantages of the use of biological control agents for fungal management.
Cuadro 3. Ventajas y desventajas del uso de agentes de control biológico para manejo de hongos.

| Ventajas | Desventajas |
|---|---|
| Mayor especificidad | Ignorancia sobre el método |
| Baja resistencia de las plagas al control biológico | Falta de apoyo económico |
| Sustitución parcial o total a los plaguicidas sintéticos de sustancias químicas | Falta de personal especializado |
| Relación coste/beneficio mayor | Antagonistas susceptibles a plaguicidas |
| Evita plagas secundarias | No provee una supresión inmediata |
| Escasas intoxicaciones | Poca investigación toxicológica |
| Amigable con el ambiente | Sobrevivencia y adaptabilidad |

Source: Guédez *et al.* (2008); Holmes *et al.* (2016). / Fuente: Guédez *et al.* (2008); Holmes *et al.* (2016). / Fuente: Guédez *et al.* (2008); Holmes *et al.* (2016).

compounds), and induced systemic resistance in plants (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2013).

Some microorganisms secrete secondary metabolites that aid in biological control. These compounds are not directly involved in the growth, development or reproduction of pathogens, but can interfere indirectly with their growth and/or activities. An example of this metabolic action is the production of antibiotics. Some microorganisms produce and secrete one or more antibiotic compounds (Liu *et al.*, 2021). The production of lytic enzymes that can hydrolyze a wide variety of polymeric compounds, such as chitin, proteins, cellulose, hemicellulose and DNA, is associated with the control of pathogens (Vargas-Hoyos and Gilchrist-Ramelli, 2015).

Another biocontrol mechanism is mycoparasitism, in which the antagonist acts as a mycoparasite, with the pathogen as the host (Steyaert *et al.*, 2003). An example of mycoparasitism (attack of a fungus by another fungus) is the genus *Trichoderma*, which is widely used as biological control agent (Alfiky and Weisskopf, 2021) against a variety of phytopathogenic fungi.

Es por ello, que se debe buscar efectividad de los agentes de control biológico para reducir la carga de inóculo del patógeno. Estos antagonistas pueden tener varios mecanismos que actúan de manera conjunta; como la competencia por espacio y nutrientes, el parasitismo, producción de metabolitos secundarios (antibióticos, enzimas líticas y compuestos volátiles), y la resistencia sistémica inducida en plantas (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2013).

Por otro lado, existen microorganismos que secretan metabolitos secundarios que colaboran en el control biológico, estos compuestos no están directamente involucrados en su crecimiento, desarrollo o reproducción, pero pueden interferir con el crecimiento y/o actividades de algún patógeno. Un ejemplo de esta acción metabólica, es la producción de antibióticos; algunos microorganismos producen y secretan uno o más compuestos con antibióticos (Liu *et al.*, 2021). Por otra parte, la producción de enzimas líticas que pueden hidrolizar una amplia variedad de compuestos poliméricos, como quitina, proteínas, celulosa, hemicelulosa y ADN, están relacionados al control de patógenos (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015).

Pathogenic fungi can also be managed through induced systemic resistance (ISR), a promising non-chemical strategy for effective disease management (Meena *et al.*, 2020). It is an infection-activated plant response that is enhanced by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) such as *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, and *Bacillus*. These bacteria represent a biological alternative for pathogen control and ecosystem conservation (Choi *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015; Moreno-Reséndez *et al.*, 2018). However, the systemic resistance response can be limited by stress conditions affecting the plant such as water deficiency, causing alterations in the signals associated with the containment of the pathogen (Arango-Velez *et al.*, 2016). In conifers, the systemic resistance response works through lignification induced by the inoculation of pathogens, as is the case with the fungi *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata* in *Pinus nigra* (Bonello and Blodgett, 2003; Blodgett *et al.*, 2007).

Nutrient competition is another mechanism that can be used to control pathogenic fungi. It is a proven biocontrol method when the growth of antagonist organisms causes the depletion of nutrients and/or the invasion of the space available for pathogens, thereby reducing their growth rate and incidence (Guerrero-Prieto *et al.*, 2011; van Lenteren *et al.*, 2018). An example of this mechanism is the bacterium *Serratia marcescens* strain PWN146, isolated from *Pinus pinaster* specimens with wilting symptoms. The genome of this bacterium contains genes associated with the production of siderophores, heavy metal transporters that are involved in the sequestration and transport of iron. The genome also contains genes related to the biosynthesis of antibiotics, such as the *igrB* gene (gramicidin), *tycC* (tyrocidine), *ppsDE* (plipastatin), and *srfAD* (surfactin), enzymes that degrade the cell wall (Chitinase Class I) and a toxin

Otro mecanismo de biocontrol es el micoparasitismo, donde el antagonista actúa como micoparásito y el patógeno es el hospedero (Steyaert *et al.*, 2003). Ejemplo de micoparasitismo (ataque de un hongo por otro hongo), es el uso del género *Trichoderma* el cual es ampliamente utilizado como agente de control biológico (Alfiky y Weisskopf, 2021) para una diversidad de hongos fitopatógenos.

Otra forma de manejar los patógenos, es la resistencia sistémica inducida (RSI), es una de las estrategias no químicas prometedoras para el manejo efectivo de las enfermedades y es adquirida después de un estímulo (Meena *et al.*, 2020). Esta respuesta es potenciada por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* durante la interacción planta-microorganismo; y representan una alternativa biológica para el control de patógenos, y conservación de ecosistemas (Choi *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015; Moreno-Reséndez *et al.*, 2018). Sin embargo, la respuesta sistémica se puede ver limitada por condiciones de estrés en la planta como la deficiencia hídrica; lo que provoca alteración en las señales involucradas en la contención de un patógeno (Arango-Velez *et al.*, 2016). La respuesta sistémica en coníferas, a partir de la lignificación inducida, se ha documentado como resultado de la inoculación de patógenos como el hongo *Sphaeropsis sapinea* y *Diplodia scrobiculata* en *Pinus nigra* (Bonello y Blodgett, 2003; Blodgett *et al.*, 2007).

Otra manera de controlar a los hongos, es por competencia de nutrientes, probado como método de biocontrol cuando el crecimiento de los antagonistas genera el agotamiento de los nutrientes y/o la invasión del espacio disponible para los agentes patógenos y por lo tanto, reducen su tasa de crecimiento y su incidencia (Guerrero-Prieto *et al.*, 2011; van Lenteren *et al.*, 2018). Un ejemplo de este mecanismo es la bacteria *Serratia marcescens* cepa

with insecticide activity (cytolytic delta-endotoxin *cyt1Aa* type-1Aa) (Vicente *et al.*, 2016).

The biological control of fungi is a method widely used in the agricultural sector. It has also been proposed for the management of forest diseases as an alternative to the use of chemical agents that can help conserve and recover forests that have been lost or degraded by disease. Table 4 shows some examples of biological control agents against fungi affecting pine trees. The most widely studied biofungicides are species belonging to *Trichoderma* and *Bacillus*.

Trichoderma. Biofungicides based on the genus *Trichoderma* are considered highly effective. They

PWN146 aislada de *Pinus pinaster* con síntomas de marchitamiento, las secuencias de su genoma mostraron genes relacionados con la producción de sideróforos para el secuestro y transporte de hierro, transportadores de metales pesados, genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos como el gen *igrB* de gramicidina, *tycC* de tirocidina, *ppsDE* de plipastatina, y *surfAD* de surfactina. Así, como enzimas que degradan la pared celular (quitinasa Clase I) y una toxina para insectos (*cyt1Aa* de endotoxina-delta citolítica tipo-1Aa) (Vicente *et al.*, 2016).

El control biológico de hongos ha sido ampliamente utilizado en el sector agrícola, y se ha propuesto también para el manejo de las enfermedades

Table 4. Use of biological control agents for the control of fungi that cause diseases in *Pinus* spp.
Cuadro 4. Uso de agentes de control biológico para el control de hongos causantes de enfermedades en *Pinus* spp.

| Agente de Biocontrol | Patógeno | Planta | Aplicación | Referencia |
|---|--------------------------------|---|--------------------------------|---------------------------------------|
| Hongos | | | | |
| a. <i>Trichoderma</i> | | | | |
| <i>T. harzianum</i> | <i>Fusarium circinatum</i> | <i>P. greggii</i> | Invernadero | García-Díaz <i>et al.</i> , 2019 |
| <i>T. koningiopsis</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>P. massoniana</i> | <i>In vitro</i>
Invernadero | Yu y Luo, 2020 |
| <i>T. harzianum</i>
<i>T. polysporum</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>In vitro</i>
Vivero | Capieau <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>T. virens</i> , <i>T. atrobrunneum</i> | <i>Armillaria</i> spp. | Robles y abetos | <i>In vitro</i>
Campo | Chen <i>et al.</i> , 2019 |
| b. Otro | | | | |
| <i>Chaetomium</i> , <i>Alternaria</i> | <i>F. circinatum</i> | <i>P. nigra</i>
<i>P. pinaster</i>
<i>P. pinea</i>
<i>P. radiata</i>
<i>P. sylvestris</i> | <i>In vitro</i>
Campo | Martínez-Álvarez <i>et al.</i> , 2016 |
| Bacterias | | | | |
| a. <i>Aneurinibacillus</i> | | | | |
| <i>Aneurinibacillus migulanus</i> | <i>Dothistroma septosporum</i> | <i>P. contorta</i> | <i>In vitro</i> | Alenezi <i>et al.</i> , 2015 |
| b. <i>Bacillus</i> | | | | |
| <i>B. pumilus</i> | <i>Sphaeropsis sapinea</i> | <i>P. massoniana</i> | <i>In vitro</i>
Invernadero | Dai <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>B. simplex</i> | <i>Heterobasidion annosum</i> | <i>P. radiata</i> | <i>In vitro</i>
Invernadero | Mesanza <i>et al.</i> , 2016 |
| | <i>Armillaria mellea</i> | | | |
| <i>B. subtilis</i> | <i>F. circinatum</i> | <i>P. radiata</i> | <i>In vitro</i>
Invernadero | Iturrutxa <i>et al.</i> , 2017 |
| | <i>Fusarium sambucinum</i> | <i>P. elliotii</i> | <i>In vitro</i>
Invernadero | Maciel <i>et al.</i> , 2014 |
| | <i>F. circinatum</i> | <i>P. taeda</i> | <i>In vitro</i> | Soria <i>et al.</i> , 2012 |

work by producing enzymes (chitinases, b-1,3 glucanases and proteases), antibiotics (6-pentyl-a-pyrone), volatile compounds, siderophores, and acid indole-3-acetic acid. They also promote plant growth (Michel-Aceves *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Rios-Velasco *et al.*, 2016; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2018; Illa *et al.*, 2020; Yu and Luo, 2020). Another mechanism associated with *Trichoderma* involves chemotropism induced by the existence of a chemical gradient of amino acids and/or sugars, recognition (physical interaction by specific binding to the host surface), penetration and finally, mycoparasitism of the host cell wall by the action of lytic enzymes. (Steyaert *et al.*, 2003; Alfiky and Weisskopf, 2021). Some studies show that strains of *Trichoderma* sp. isolated from forest plants have the ability to biocontrol pathogenic fungi of the genus *Armillaria*, which causes root rot (Chen *et al.*, 2019). Commercial products such as Binab® TF.WP, formulated with strains of *Trichoderma harzianum* and *T. polysporum*, have been used as fungicides and have been as effective as the chemical fungicide (tolylfluanine 50% p/p) recommended against *Botrytis cinerea*. They have also reduced needle damage in *P. sylvestris* by up to 94% in growth chambers and by 57% under nursery conditions (Capieau *et al.*, 2004). *T. harzianum* (PHC®) reduces the incidence of the disease caused by *F. circinatum* in *P. greggii* seedlings by up to 22% (García-Díaz *et al.*, 2019). *T. koningiopsis* inhibits the growth of *F. oxysporum* (*in vitro*) by up to 78.6% and decreases the incidence of the disease by 50% in *P. massoniana* while promoting seedling growth (Yu and Luo, 2020).

Bacillus. It is the most exploited bacterial genus for the production of biofungicides due to its versatility in terms of biological control mechanisms. Members of this genus can produce volatile compounds, antibiotics (bacillomycin, iturins, phenycins, fengycins, subtilins,

forestales, como alternativa al combate químico para conservar y recuperar bosques que se han perdido o degradado por las enfermedades. Algunos ejemplos de agentes de control biológico de hongos en árboles de pino se muestran en el Cuadro 4, con los biofungicidas más estudiados que corresponden a *Trichoderma* y *Bacillus* principalmente.

Trichoderma. Algunos biofungicidas están basados en el uso del género *Trichoderma*, y se consideran de alta efectividad al producir enzimas (quitinasas, b-1,3 glucanasas y proteasas), antibióticos (6-pentil-a-pirone), compuestos volátiles, sideróforos, ácido indol-3-acético; y promover el crecimiento vegetal (Michel-Aceves *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Rios-Velasco *et al.*, 2016; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2018; Illa *et al.*, 2020; Yu y Luo, 2020). Otro de sus mecanismos implica un quimiotropismo ocasionado por un gradiente químico de aminoácidos y/o azúcares, reconocimiento (interacción física por uniones específicos de superficie del huésped), penetración y finalmente, el micoparasitismo de la pared celular del huésped por la acción de enzimas líticas (Steyaert *et al.*, 2003; Alfiky y Weisskopf, 2021). Algunas investigaciones demuestran que cepas de *Trichoderma* sp. aisladas del bosque, tienen la capacidad de biocontrolar hongos patógenos del género *Armillaria*, que causa podredumbre en la raíz de árboles forestales (Chen *et al.*, 2019). Se han utilizado productos comerciales como Binab® TF.WP formulado por cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma polysporum*, igual de efectivo que el fungicida químico recomendado (tolilfluanina 50% p/p) contra *Botrytis cinerea*, también reduce el daño en acículas hasta 94% en cámaras de crecimiento y 57% bajo condiciones de vivero en *P. sylvestris* (Capieau *et al.*, 2004). *T. harzianum* de PHC®, reduce hasta el 22% la incidencia de la enfermedad ocasionada por *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii* (García-Díaz *et al.*, 2019); y *T.*

surfactins), lytic enzymes (chitinases and b-1,3-glucanases), siderophores (Bacillibactin), and toxins (d-endotoxins). They also have the ability to promote plant growth (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017; Jiménez-Delgadillo *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2019; Ocegueda-Reyes *et al.*, 2020; Dai *et al.*, 2021). Some studies have shown that these bacteria can induce a systemic resistance response in plants by eliciting molecules (lipopeptides, phytohormones, and volatile compounds). They also activate the synthesis of salicylic acid, ethylene, jasmonic acid and abscisic acid, which regulate the defense system of different crop plants (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017; Vinod and Sabah, 2018). *B. subtilis* has demonstrated its ability to control fungi, inhibiting up to 18.7% of the *in vitro* growth of *F. sambucinum*, and providing greater vigor and growth to *P. elliotii* seedlings (Maciel *et al.*, 2014). The secondary metabolites produced by *B. subtilis* represent an efficient fungicide alternative. They inhibit 50% of the growth of *F. circinatum* isolated from *P. taeda* (Soria *et al.*, 2012). Biocontrol methods have managed to reduce the high incidence and severity of *F. circinatum* infection in *P. radiata* and *P. muricata* (Gordon *et al.*, 2006). In addition, *B. simplex* is capable of biocontrolling *Heterobasidion annosum* and *Armillaria mellea* *in vitro*. It also reduces by 55% the infection incidence of *H. annosum* and by 46.9% the infection incidence of *A. mellea* in *P. radiata* seedlings (Mesanza *et al.*, 2016). *B. simplex* also has antagonistic activity against *F. circinatum* (17%) *in vitro* and reduces *P. radiata* lesions by up to 22% in two-year-old trees grown in greenhouses (Iturrirxa *et al.*, 2017). *B. pumilus* isolated from *P. massoniana* can biocontrol 85% of the damage caused by *Sphaeropsis sapinea* *in vitro* and 90% under greenhouse conditions due to the production of secondary metabolites that damage the mycelium and delay spore germination (Dai *et al.*, 2021).

koningiopsis inhibe hasta 78.6% el crecimiento de *F. oxysporum* (*in vitro*) además, disminuye al 50% la incidencia de la enfermedad y promueve el crecimiento de plántulas de *P. massoniana* (Yu y Luo, 2020).

Bacillus. Es el género bacteriano más explotado para la producción de biofungicidas debido a su versatilidad de mecanismos de control biológico, como la producción de compuestos volátiles, antibióticos (bacilomicina, iturinas, fenicinas, fengicinas, subtilinas, surfactinas), enzimas líticas (quitinasas y b-1,3-glucanases), sideróforos (Bacillibactina), toxinas (d-endotoxinas); además de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017; Jiménez-Delgadillo *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2019; Ocegueda-Reyes *et al.*, 2020; Dai *et al.*, 2021). Algunos estudios han demostrado que estas bacterias, pueden inducir respuesta sistémica en plantas por moléculas elicitoras (lipopéptidos, fitohormonas y compuestos volátiles), y activa la síntesis de ácido salicílico, etileno, ácido jasmónico y ácido abscísico que regulan el sistema de defensa de diferentes cultivos agrícolas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017; Vinod y Sabah, 2018). *B. subtilis* ha demostrado su capacidad como control de hongos, inhibe hasta 18.7% el crecimiento *in vitro* de *F. sambucinum*, y proporciona mayor vigor y crecimiento a las plántulas de *P. elliotii* (Maciel *et al.*, 2014). Los metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis* representan una alternativa, ya que inhiben 50% el crecimiento de *F. circinatum* aislado de *P. taeda* (Soria *et al.*, 2012). El biocontrol ha logrado disminuir la alta incidencia y severidad de la infección por *F. circinatum* en *P. radiata* y *P. muricata* (Gordon *et al.*, 2006). Además, *B. simplex* a nivel *in vitro* es capaz de biocontrolar a *Heterobasidion annosum* y *Armillaria mellea*, también reduce la incidencia de infección al 55% de *H. annosum* y 46.9% de *A. mellea* en plántulas de *P. radiata* (Mesanza *et al.*,

CONCLUSIONS

Pine forests are ecosystems of great importance due to the ecological, economic, and social benefits they provide. The global forest biomass has been reduced by several factors such as excessive logging and the conversion of forests into agricultural or residential areas. In addition, forests face biotic problems such as fungal diseases that spread through natural and anthropogenic factors. Therefore, it is important to have a comprehensive understanding of the various fungi that have been reported to infect pine species (*Alternaria*, *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Cylindrocarpon*, *Cronartium*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Diplodia*, *Dothistroma*, *Fusarium*, *Meria*, *Mycosphaerella*, *Lecanosticta*, *Lophodermium*, *Phytophthora*, *Pythium*, and *Rhizoctonia*, among others). It is also important to know the different factors involved in plant fungal infections, such as the host, environmental conditions, management, and anthropogenic influences.

In Mexico, the forestry sector has made excessive use of chemical products to control fungi; however, these products are registered for agricultural and non-forestry use. Given the recent interest in reducing the use of agrochemicals, the use of biological control agents is promoted as a friendly alternative for the recovery of forests with no negative ecological impact. These products can be implemented in urban areas since they pose no danger to people or animals that interact with forests.

The information documented in the present work shows that *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. are the most studied biofungicides associated with *Pinus* spp. The use of these agents helps maintain and conserve forest resources. Further research is needed to promote the use, management and conservation of forests with biological methods that allow to control phytopathogenic species.

2016). *B. simplex in vitro* también presenta actividad antagonista en *F. circinatum* (17%), y disminuye hasta 22% las lesiones en árboles de dos años de *P. radiata* a nivel invernadero (Iturrutxa *et al.*, 2017). Por otro lado, *B. pumilus* aislada de *P. massoniana* puede biocontrolar el 85% de la afectación causada por *Sphaeropsis sapinea* a nivel *in vitro* y 90% bajo condiciones de invernadero, debido a la producción de metabolitos secundarios que dañan al micelio y retrasan la germinación de esporas (Dai *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

Los bosques de pino son ecosistemas de gran importancia por los beneficios ecológicos, económicos, y sociales que nos brindan; sin embargo, se ha reducido esta biomasa boscosa por varios factores como la tala inmoderada, la conversión de bosques en áreas agrícolas o habitacionales. Adicionalmente, los bosques se enfrentan ante problemas de tipo biótico como enfermedades fúngicas que se propagan a través de factores naturales y antrópicos. Por ello, es importante tener una comprensión integral de los diversos hongos que se han reportado en especies de pino (*Alternaria*, *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Cylindrocarpon*, *Cronartium*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Diplodia*, *Dothistroma*, *Fusarium*, *Meria*, *Mycosphaerella*, *Lecanosticta*, *Lophodermium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, entre otros) como causantes de enfermedades; conocer los diferentes factores que interaccionan en este sistema como el hospedero, las condiciones ambientales, manejo, así como la influencia antropogénica del hombre sobre la incidencia y severidad de estos hongos.

En México el sector forestal ha usado de forma excesiva los productos químicos para el control de hongos, no obstante, estos productos tienen registro para uso agrícola y no forestal. Ante la preocupación

ACKNOWLEDGEMENT

To the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the Doctoral Scholarship in Environmental Sciences awarded to Luis Martín Gutiérrez Flores (Scholarship No. 742331). To the Vicerectoría de Investigación y Estudios de Posgrados (VIEP) of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), for the financial support of the research project: “Diagnosis of the fungal disease of *Pinus patula* from Tetela de Ocampo, Puebla and proposal for biocontrol” (100155588-VIEP 2017-2020).

LITERATURA CITADA

- Adusei-Fosu K and Rolando CA. 2018. Chemical control -review of control methods and fungicides. Ministry for Primary Industries Biosecurity. New Zealand Technical Paper No. 2019/24. Wellington, New Zealand. 31p. <http://www.mpi.govt.nz/news-and-resources/publications/>
- Ahumada R, Rotella A, Slippers B and Wingfield MJ. 2013. Pathogenicity and sporulation of *Phytophthora pinifolia* on *Pinus radiata* in Chile. Australasian Plant Pathology 42: 413-420. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0212-4>
- Alenezi FN, Fraser S, Beřka M, Doęmuř TH, Heckova Z, Oskay F, Belbahri L and Woodward S. 2015. Biological control of *Dothistroma* needle blight on pine with *Aneurinibacillus migulanus*. Forest Pathology 46(5): 555–558. <https://doi.org/10.1111/efp.12237>
- Alfiky A and Weisskopf L. 2021. Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. Journal of Fungi 7(1): 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
- Arango-Velez A, El Kayal W, Copeland CCJ, Zaharia LI, Lusebrink I and Cooke JEK. 2016. Differences in defense responses of *Pinus contorta* and *Pinus banksiana* to the mountain pine beetle fungal associate *Grosmannia clavigera* are affected by water deficit. Plant, Cell and Environment 39(4): 726–744. <https://doi.org/10.1111/pce.12615>
- Balvanera P. 2012. Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. Ecosistemas 21(1-2): 136–147. <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/33>
- Behnke-Borowczyk J, Kwařna H and Kulawinek B. 2018. Fungi associated with *Cyclaneusma* needle cast in Scots pine in the west of Poland. Forest Pathology 49(2): e12487. <https://doi.org/10.1111/efp.12487>
- Belén M, Errasti A y Villacide J. 2011. Patagonia y su asociación con plagas entomológicas Manejo Integrado de Plagas Forestales. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 14p.
- Blodgett TJ, Eyles A and Bonello P. 2007. Organ-dependent induction of systemic resistance and systemic susceptibility in *Pinus nigra* inoculated with *Sphaeropsis sapinea* and

de reducir la aplicación de agroquímicos, se buscar fomentar el uso de agentes de control biológico como alternativa amigable para la recuperación de los bosques sin generar un impacto negativo. Además, estos productos se pueden implementar en áreas urbanas donde no se tendría peligro para las personas o animales que interactúan con los bosques.

La información documentada en este trabajo muestra a *Trichoderma* sp. y *Bacillus* spp. como los biofungicidas más estudiados en *Pinus* sp. cuya aplicación hace factible el mantenimiento y la conservación de los recursos forestales. Sin embargo, se requiere ampliar las investigaciones en esta área poco estudiada con el fin de contribuir al uso, manejo y conservación de los forestales con un enfoque más biológico para manejar especies fitopatógenas, partiendo de la comprensión de la salud de los forestales y los subsistemas que interactúan con ellos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca de Doctorado en Ciencias Ambientales otorgada a Luis Martín Gutiérrez Flores (No. de Beca 742331). A la Vicerectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), por el apoyo económico del proyecto de investigación: “Diagnóstico de la enfermedad fúngica de *Pinus patula* de Tetela de Ocampo, Puebla y propuesta de biocontrol” (100155588-VIEP 2017-2020).

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

- Diplodia scrobiculata*. Tree Physiology 27(4): 511–517. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.4.511>
- Bonello P and Blodgett TJ. 2003. *Pinus nigra*-*Sphaeropsis sapinea* as a model pathosystem to investigate local and systemic effects of fungal infection of pines. Physiological and Molecular Plant Pathology 63(5): 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.02.002>

- Bravo N, Grimalt JO, Mazej D, Tratnik JS, Sarigiannis DA and Horvat M. 2020. Mother/child organophosphate and pyrethroid distributions. *Environment International* 134(2020): 105264. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105264>
- Brown S and Verschuuren B. 2018. Cultural and spiritual significance of nature in protected and conserved areas: The 'deeply sated bond'. Pp:1-13. *In*: Brown S and Verschuuren B (eds.). *Cultural and Spiritual Significance of Nature in Protected Areas: Governance, Management and Policy*. Routledge. London. 334p. <https://doi.org/10.4324/9781315108186-1>
- Capieau K, Stenlid J and Stenström E. 2004. Potential for biological control of *Botrytis cinerea* in *Pinus sylvestris* seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research* 19(4): 312–319. <https://doi.org/10.1080/02827580310019293>
- Carrasco A, Sanfuentes E, Durán A y Valenzuela S. 2016. Cáncer resinoso del pino: ¿una amenaza potencial para las plantaciones de *Pinus radiata* en Chile?. *Gayana Botánica* 73(2): 369-380. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432016000200369>
- Chen L, Bóka B, Kedves O, Nagy VD, Szucs A, Champramary S, Roszik R, Patocskaï Z, Münsterkötter M, Huynh T, Indic B, Vágvölgyi C, Sipos G and Kredics L. 2019. Towards the biological control of devastating forest pathogens from the genus *Armillaria*. *Forests* 10(11): 1013. <https://doi.org/10.3390/f10111013>
- Choi HK, Song GC, Yi HS and Ryu CM. 2014. Field Evaluation of the Bacterial Volatile Derivative 3-Pentanol in Priming for Induced Resistance in Pepper. *Journal of Chemical Ecology* 40(2014): 882–892. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0488-z>
- Cibrián TD, Alvarado-Rosale D y García-Díaz SE. 2007. Enfermedades forestales en México/Forest Diseases in Mexico. UACH; Conafor-Semarnat, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587p.
- COFEPRIS. Comisión Federal para Protección contra Riesgos Sanitarios. 2019. Consulta de Registros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y LMR. <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp> (consulta, septiembre 2020).
- Cram MM, Frank MS and Mallams KM. 2012. *Forest Nursery Pests*. Agriculture Handbook 680, USDA Forest Service. Washington, DC, USA. 202p. <https://www.fs.usda.gov/treearch/pubs/54434>
- Dai Y, Wu XQ, Wang YH and Zhu ML. 2021. Biocontrol potential of *Bacillus pumilus* HR10 against *Sphaeropsis* shoot blight disease of pine. *Biological Control* 152(2021): 104458. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104458>
- DEAQ. 2022. *Diccionario de Especialidades Agroquímicas*. 32th Edición. PLM. Cd. de México, México. 1178p. <https://www.agroquimicos-organicosplm.com/>
- del Puerto RAM, Suárez TS y Palacio EDE. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 52(3): 372–387. <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n3/hig10314.pdf>
- FAO and UNEP. 2020. *The State of the World's Forests 2020*. FAO and UNEP. Roma. 224p. <https://doi.org/10.4060/ca8642en>
- FAO and WHO. 2016. *International Code of Conduct on Pesticide Management. Guidelines on highly hazardous pesticides*. FAO and WHO. Roma. 37p. [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications)
- FAO. 2011. *FAO state of the world's forests*. In *Forestry Chronicle*. 9th Edición. Vol. 80, Issue 2. FAO. Roma. 164p. <http://www.fao.org/3/i2000e/i2000e.pdf>
- FAO. 2018. *The state of the world's Forest*. FAO. Roma. 118p. <https://doi.org/10.1016/b0-12-145160-7/00156-3>
- Ferrer A. 2003. Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 26:155–171. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272003000200009>
- Flores-Pacheco JA. 2017. Cáncer resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) historia, evolución, dispersión y estrategia de manejo. *Nexo Revista Científica* 30(1): 19-42. <http://dx.doi.org/10.5377/nexo.v30i01.5170>
- Flores-Villegas MY, González-Laredo RF, Pompa-García M, Ordaz-Díaz LA, Prieto-Ruiz JA y Domínguez-Calleros PA. 2019. Uso de plaguicidas y nuevas alternativas de control en el sector forestal. *Foresta Veracruzana* 21(1): 29–38. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/497/49759430007/html/index.html>
- García-Díaz SE, Aldrete A, Alvarado-Rosales D, Cibrián-Tovar D and Méndez-Montiel JT. 2019. *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell in seedlings of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. in three substrates. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 25(3): 353–367. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.12.088>
- Gepp V, Vero S, Cassanello ME, Romero G, Silvera E, González P, Rebellato J, Ferreira Y y Bentancur O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 16(1): 97–107. [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2301-15482012000100012](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482012000100012)
- Gordon TR, Kirkpatrick SC, Aegerter BJ, Wood DL and Storer AJ. 2006. Susceptibility of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph = *Fusarium circinatum*). *Plant Pathology* 55(2): 231–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01351.x>
- Guédez C, Castillo C, Cañizales L and Olivar R. 2008. "Biological control" a tool for sustaining and sustainable development. *Academia* 7(13): 50–74. <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/academia/article/view/6030>
- Guerra C, Cruz H, Vila I, Duarte A y López MO. 2004. Principales hongos que afectan a *Pinus tropicalis* Morelet en Cuba. *Fitosanidad* 8(2): 9-12. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209117836001.pdf>
- Guerrero-Prieto VM, Blanco Pérez AC, Guigón López C, Tamayo Urbina CJ, Molina Corral FJ, Berlanga Reyes DI, Carvajal Millan E y Ávila Quezada GD. 2011. Competencia por Nutrientes; Modo de Acción de *Candida oleophila* Contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29(2): 90–97. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n2/v29n2a1.pdf>
- Guo LD, Huang GR and Wang Y. 2008. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal*

- of Integrative Plant Biology 50(8): 997–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00394.x>
- Guo S, Li X, He P, Ho H, Wu Y and He Y. 2015. Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42(6): 925–937. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1612-y>
- Gutiérrez-Flores LM, Mauricio-Gutiérrez A, Carcaño-Montiel MG, Portillo-Manzano E, Gómez-Velázquez L, Sánchez-Alonso P and López-Reyes L. 2020. Fungi associated with sick trees of *Pinus patula* in Tetela de Ocampo, Puebla, Mexico. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 53(13-14): 591-611. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1778241>
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez-Del Valle MG y Hernández-Rodríguez A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 66–74. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a9.pdf>
- Heydari A and Pessaraki M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 273–290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- Holmes L, Mandjiny S and Upadhyay D. 2016. Biological Control of Agriculture Insect Pests. *European Scientific Journal* 12 (SPECIAL edition): 216–225. <https://core.ac.uk/download/pdf/236413921.pdf>
- Illa C, Pérez AA, Torassa M y Pérez MA. 2020. Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(1): 119-131. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-6>
- Infante D, Martínez B, González N y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal* 24(1): 14–21. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002)
- Iturrutxa E, Trask T, Mesanza N, Raposo R, Elvira-Recuenco M and Patten CL. 2017. Biocontrol of *Fusarium circinatum* infection of young *Pinus radiata* Trees. *Forests* 8(2): 32. <https://doi.org/10.3390/f8020032>
- Jiménez-Delgado R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R y García-Hernández JL. 2018. Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 256-275. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1711-3>
- Kang X, Guo Y, Leng S, Xiao L, Wang L, Xue Y and Liu C. 2019. Comparative transcriptome profiling of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat roots in the absence and presence of biocontrol *Bacillus velezensis* CC09. *Frontiers in Microbiology* 10: 1474. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01474>
- Ken S, Sasaki N, Entani T, Ma HO, Thuch P and Tsusaka TW. 2020. Assessment of the local perceptions on the drivers of deforestation and forest degradation, agents of drivers, and appropriate activities in Cambodia. *Sustainability* 12(23): 9987. <https://doi.org/10.3390/su12239987>
- Larsson R, Menkis A and Olson A. 2021. *Diplodia sapinea* in Swedish forest nurseries. *Plant Protection Science* 57(1): 66-69. <https://doi.org/10.17221/68/2020-PPS>
- Legrand F, Picot A, Cobo-Díaz JF, Chen W and Le Floch G. 2017. Challenges facing the biological control strategies for the management of Fusarium Head Blight of cereals caused by *F. graminearum*. *Biological Control* 113(2017): 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.06.011>
- Liu X, Cao A, Yan D, Ouyang C, Wang Q and Li Y. 2021. Overview of mechanisms and uses of biopesticides. *International Journal of Pest Management* 67(1): 65–72. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>
- Maciel CG, Walker C, Muniz MF and Araújo MM. 2014. Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* (UFV3918) to *Fusarium sambucinum* in *Pinus elliottii* Engelm. *Revista Árvore* 38(3): 505–512. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622014000300013>
- Marmolejo-Monciváis JG. 2018. Distribución vertical de hongos en hojas de tres especies de pinos en Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 9(50): 379–399. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i50.253>
- Marsberg A, Kemler M, Jami F, Nagel JH, Postma-Smidt A, Naidoo S, Wingfield MJ, Crous PW, Spatafora JW, Hesse CN, Robbertse B and Slippers B. 2017. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology* 18(4): 477–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>
- Martínez B, Infante D y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28(1): 1–11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
- Martínez-Álvarez P, Fernández-González RA, Sanz-Ros AV, Pando V and Diez JJ. 2016. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control* 94(2016): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.11.011>
- Meena M, Swapnil P, Divyanshu K, Kumar S, Harish, Tripathi YN, Zehra A, Marwal A and Upadhyay RS. 2020. PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *Journal of Basic Microbiology* 60(10): 828–861. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000370>
- Mesanza N, Iturrutxa E, Patten CL. 2016. Native rhizobacteria as biocontrol agents of *Heterobasidion annosum* s.s. and *Armillaria mellea* infection of *Pinus radiata*. *Biological Control* 101: 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.003>
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Rebolledo-Domínguez O y Lezama-Gutiérrez R. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6 pentil-a-pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(1):14-21. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222103.pdf>
- Mora-Aguilera G, Cortez-Madrigal H and Acevedo-Sánchez G. 2017. Epidemiology of entomopathogens: Basis for rational use of microbial control of insects. *Southwestern Entomologist* 42(1): 153-169. <https://doi.org/10.3958/059.042.0116>
- Moreno-Reséndez A, Carda Mendoza V, Reyes Carrillo JL, Vásquez Arroyo J y Cano Ríos P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de

- biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20(1): 68–83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Moreno-Rico O, Sánchez-Martínez G, Marmolejo-Monsiváis JG, Pérez-Hernández K y Moreno-Manzano CE. 2015. Diversidad de hongos Ophiostomatoideos en pinos de la sierra Fría de Aguascalientes, México, asociados con *Dendroctonus mexicanus*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86(2015): 1-8. <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.46751>
- Narváez-Valderrama JF, Palacio Baena JA y Molina-Pérez FJ. 2012. Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural. *Gestión y Ambiente* 15(3): 27–38. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169424893002>
- NJ Health, State of New Jersey Department of Health. 2017. Hazardous Substance. <https://www.nj.gov/health/workplacehealthandsafety/right-to-know/hazardous-substances/> (consulta, junio 2022).
- Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solís J, Virgen-Calleros G, González-Eguarte DR, López-Alcocer E y Olalde-Portugal V. 2020. Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagonicas a *Sclerotium cepivorum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(1): 146-159. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-2>
- Ortiz I, Avila-Chávez MA y Torres LG. 2014. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 5(1): 26–46. <https://doi.org/10.7603/s40682-014-0003-9>
- Oskay F, Laas M, Mullett M, Lehtijärvi A, Doğmuş-Lehtijärvi HT, Woodward S and Drenkhan R. 2020. First report of *Lecanosticta acicula* on pine and non-pine hosts in Turkey. *Forest Pathology* 50(6): e12654. <https://doi.org/10.1111/efp.12654>
- Osorio MO. 2007. *Ceratocystis pilifera*, hongo causante de mancha azul en madera de *Pinus radiata*. *Bosque* 6(2): 116-119. <https://doi.org/10.4206/bosque.1985.v6n2-07>
- Ospina PCM, Hernández RRJ, Rincón EA, Sánchez OFA, Urrego MJB, Rodas PCA, Ramírez CCA y Riaño HNM. 2011. El *Pinus patula*. *Pinus patula* Schiede and Deppe in Schlecht. & Cham. Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana. Editorial Blanecolor S. A. S. Manizales, Colombia. 104p. <https://www.cenicafe.org/es/publications/pinus.pdf>
- Queloz V, Wey T and Holdenrieder O. 2014. First record of *Dothistroma pini* on *Pinus nigra* in Switzerland. *Plant Disease* 98(12): 1744. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0630-PDN>
- Raitelaityté K, Markovskaja S, Paulauskas A, Hsiang T and Oszako T. 2020. First molecular detection of *Lecanosticta acicula* from Poland on *Pinus mugo*. *Forest Pathology* 50(2): e12589. <https://doi.org/10.1111/efp.12589>
- Ramírez JA y Lacasaña M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Archivos de Prevención de Riesgos Laborales 4(2): 67–75. [http://sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01\\_11-59-0899004.pdf](http://sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01_11-59-0899004.pdf)
- Reglinski T and Dick M. 2005. Biocontrol of forest nursery pathogens. *New Zealand Journal of Forestry* 50(3): 19–26. [http://www.nzjf.org.nz/free\\_issues/NZJF50\\_3\\_2005/CD6F47DA-12F9-4F5A-9914-BEABE49C0054.pdf](http://www.nzjf.org.nz/free_issues/NZJF50_3_2005/CD6F47DA-12F9-4F5A-9914-BEABE49C0054.pdf)
- Reignoux SNA, Green S and Ennos RA. 2014. Molecular identification and relative abundance of cryptic *Lophodermium* species in natural populations of Scots pine, *Pinus sylvestris* L. *Fungal Biology* 118(9-10): 835–845. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.07.002>
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM. 2016. Identificación y actividad antagonica *in vitro* de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(1): 84-99. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Robles-Yerena L, Leyva-Mir SG, Cruz-Gómez A, Camacho-Tapia M, Nieto-Ángel D y Tovar-Pedraza JM. 2016. *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 7(36): 25-36. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11322016000400025&script=sci\\_abstract&tling=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11322016000400025&script=sci_abstract&tling=es)
- Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Olivas-Orozco GI, Acosta-Muñiz CH, Sepúlveda-Ahumada DR, Pérez-Corral DA, Rios-Velasco C, Salas-Marina MA y Fernández-Pavía SP. 2018. Efecto de *Trichoderma* spp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 444-456. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1804-5>
- Sanz-Ros AV, Müller MM, San Martín R and Diez JJ. 2015. Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Northern Spain. *Fungal Biology* 119(10): 870–883. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.008>
- Serra AA, Bittebière AK, Mony C, Slimani K, Pallois F, Renault D, Couée I, Gouesbet G and Sulmon C. 2020. Local-scale dynamics of plant-pesticide interactions in a northern Brittany agricultural landscape. *Science of the Total Environment* 744(2020): 140772. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140772>
- Sheller MA, Shilkina EA, Ibe AA, Razdorozhnaya TY and Sukhikh T. 2020. Phytopathogenic fungi in forest nurseries of Middle Siberia. *iForest* 13(6): 507-512. <https://doi.org/10.3832/IFOR3507-013>
- Soria S, Alonso R and Bettucci L. 2012. Endophytic Bacteria from *Pinus taeda* L. as Biocontrol Agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(2): 281–284. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392012000200018>
- Speck-Planche A, Kleandrova VV, Luan F and Cordeiro MNDS. 2012. Predicting multiple ecotoxicological profiles in agrochemical fungicides: A multi-species chemoinformatic approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.018>
- Springgay E. 2019. Forest as Nature-based solutions for water. *Unasylva* 70(1): 3–13. <http://www.fao.org/3/ca6842en/CA6842EN.pdf>
- Stadler M, Læssøe T, Fournier J, Decock C, Schmieschek B, Tichy HV and Peršoh D. 2014. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (*Xylariaceae*). *Studies in Mycology* 77(1): 1–143. <https://doi.org/10.3114/sim0016>



- Steyaert JM, Ridgway HJ, Elad Y and Stewart A. 2003. Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 31(4): 281–291. <https://doi.org/10.1080/01140671.2003.9514263>
- Tobón-Marulanda FÁ, López-Giraldo LA y Paniagua-Suárez RE. 2010. Contaminación del agua por plaguicidas en un área de Antioquia. *Revista de Salud Pública* 12(2): 300–307. <https://doi.org/10.1590/s0124-00642010000200013>
- van der Nest A, Wingfiel MJ, Ortiz PC and Barnes I. 2019. Biodiversity of *Lecanosticta* pine-needle blight pathogens suggest a Mesoamerican Centre of origin. *IMA Fungus* 10: 2. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0004-8>
- van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ and Urbaneja A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63: 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Vargas-Hoyos HA y Gilchrist-Ramelli E. 2015. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología* 42: 9–16. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v42/v42a3.pdf>
- Vicente CSL, Nascimento FX, Barbosa P, Ke HM, Tsai IJ, Hirao T, Cock PJA, Kikuchi T, Hasegawa K and Mota M. 2016. Evidence for an Opportunistic and Endophytic Lifestyle of the *Bursaphelenchus xylophilus*-Associated Bacteria *Serratia marcescens* PWN146 Isolated from Wilting *Pinus pinaster*. *Microbial Ecology* 72(3): 669–681. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0820-y>
- Villacide J y Corley J. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. INTA, Cambio Rural. Cuadernillo No. 15 Serie Técnica: Manejo integrado de plagas forestales. Vol. 15. Río Negro, Argentina. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-control\\_biologico\\_de\\_plagas.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-control_biologico_de_plagas.pdf)
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI y De los Santos-Villalobos S. 2017. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95–130. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Vinod K and Sabah A. 2018. Plant Defense against Pathogens: The Role of Salicylic Acid. *Research Journal of Biotechnology* 13(12): 97–103. <https://www.researchgate.net/publication/329244822>
- Yang LN, He MH, Ouyang HB, Zhu W, Pan ZC, Sui QJ, Shang LP and Zhan J. 2019. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology* 19(1): 205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>
- Yu C and Luo X. 2020. *Trichoderma koningiopsis* controls *Fusarium oxysporum* causing damping-off in *Pinus massoniana* seedlings by regulating active oxygen metabolism, osmotic potential, and the rhizosphere microbiome. *Biological Control* 150: 104352. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104352>

# Incidence of monkey's hand in maize germplasm from different locations in Mexico

## Incidencia de la mano de chango en germoplasma de maíz (*Zea mays*) en diferentes localidades de México

José Jesús Márquez-Diego, Carlos De León-García de Alba\*, Reyna Isabel Rojas-Martínez, <sup>1</sup>Programa de posgrado en Fitosanidad-Fitopatología; J. Concepción Rodríguez-Maciél, Programa de Posgrado de Fitosanidad-Entomología; <sup>1</sup>Cristián Nava-Díaz. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Edo. de México, CP 56230.

\*Corresponding author: cdeleon@colpos.mx.

Received: April 19, 2022.

Accepted: June 05, 2022.

Márquez-Diego JJ, De León-García de Alba C, Rojas-Martínez RI, Rodríguez-Maciél JC and Nava-Díaz C. 2022. Incidence of monkey's hand in maize germplasm from different locations in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 425-432.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2204-1>

First DOI publication: June 28, 2022.

Primera publicación DOI: 28 de Junio, 2022.

**Abstract.** The incidence of maize monkey's hand disease was determined in nine states of the Mexican Republic. The evaluation sites were georeferenced, and incidence was estimated along with the farmers to determinate the identity of the germplasm used. Monkey's hand was found affecting maize plants in localities of the States of Puebla with an incidence of 24%, Hidalgo (17.05%), Morelos (11.7%), Chiapas (7.28%), Tlaxcala (7.0%), Oaxaca (6.5%), Veracruz (6.3%), Mexico (6.2%), and Jalisco (3.0%). Data showed a low but positive correlation

**Resumen.** El objetivo de esta investigación, fue determinar la incidencia y distribución de la enfermedad mano de chango en maíz en nueve estados de la República Mexicana (Tlaxcala, Puebla, Edo. de México, Hidalgo, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Chiapas y Jalisco). Los sitios de evaluación se georreferenciaron, se estimó la incidencia y se realizó una encuesta con los productores para determinar la identidad del germoplasma utilizado. La mano de chango se encontró afectando plantas de maíz en localidades de los estados de Puebla con incidencia de 24%, Hidalgo (17.05%), Morelos (11.7%), Chiapas (7.28%), Tlaxcala (7.0%), Oaxaca (6.5%), Veracruz (6.3%), Edo. de México (6.2%), y Jalisco (3.0%). Los datos mostraron una correlación baja, pero positiva ( $r=0.30$ ) entre la altitud y la incidencia. Observaciones indicaron que el germoplasma nativo es más susceptible a la enfermedad que el mejorado.

**Palabras clave:** Proliferación de mazorcas, enfermedades de maíz, "bouquet ears".

( $r = 0.30$ ) between altitude and incidence. Native germplasm is more susceptible to the monkey's hand disease than improved germplasm.

**Key words:** monkey's hand, maize diseases, bouquet ears.

Since 1997, maize cultivation has ranked first in planted area and production worldwide (CIMMYT, 2019). In 2021, 8.5 M ha were planted in Mexico with a per capita consumption of 297 kg. Despite the national importance of maize, the average national production is 3.47 t ha<sup>-1</sup>, lower than the world average of 5.38 t ha<sup>-1</sup> and well below that of the United States of America, which produces an average of 10.96 t ha<sup>-1</sup> (CIMMYT, 2019). Mexico is one of the major importers of maize. In the 1980s, it imported 3 Mt, an amount that increased to 5 Mt in 2000 (Reyes-Santiago *et al.*, 2022). A record of more than 17 M t were imported in 2018 (CEDRSSA, 2019) and more than 16 M t in 2020 (SIAVI, 2021). In 2021, Mexico used more than US \$5000 000 to purchase white and yellow maize (GCMA, 2022).

One of the several maize diseases includes the Multiple Ears on Same Shank syndrome (Bonnet, 1966), known as MESS (Nielsen, 1999), or Bouquet Ears (Nielsen, 2014). There are only a few reports of this condition, all from recent years, due its low incidence and importance (Ortez *et al.*, 2022). Moreover, its etiology has not been determined yet (Elmore and Abendroth, 2006; Ciampitti, 2014; Thomison and Geyer, 2015; Moghadam *et al.*, 2022).

In Mexico, in 1991, an abnormality was recorded in maize plants involving the development of multiple ears from the main one. Cruz (1991) called it "maize's little hand" (manita del maiz), while Hernández (1993) ruled it out as

Desde 1997, el cultivo de maíz ocupa el primer lugar en la superficie y producción a nivel mundial (CIMMYT, 2019). En 2021, en México se sembraron 8.5 M ha y su consumo *per cápita* fue de 297 kg. Pese a la importancia nacional, se tiene una media de producción nacional de 3.47 t ha<sup>-1</sup>, inferior al promedio mundial de 5.38 t ha<sup>-1</sup> y muy abajo del de Estados Unidos de Norteamérica con una media de 10.96 t ha<sup>-1</sup> (CIMMYT, 2019). México es uno de los grandes importadores del cereal, puesto que en los 80s se importaban 3 Mt de maíz, ésta cantidad se incrementó a 5 Mt en el 2000 (Reyes-Santiago *et al.*, 2022). Fue en 2018 cuando se registraron compras históricas mayores a 17 M t (CEDRSSA, 2019) que se ha mantenido en más de 16 M t en 2020 (SIAVI, 2021), representando en 2021 más de \$5000 M USD involucrados en compras maíz blanco y amarillo (GCMA, 2022).

Dentro del complejo de enfermedades del maíz, existe un síntoma de producción múltiple de jilotes (Bonnet, 1966), denominada como MESS ("Multiple Ears on Same Shank") (Nielsen, 1999), o "Bouquet ears" (Nielsen, 2014), de la que existen pocos reportes debido a los bajos niveles de incidencia e importancia que se presentaron en los últimos años (Ortez *et al.*, 2022) y cuya etiología no ha sido determinada (Elmore y Abendroth, 2006; Ciampitti, 2014; Thomison y Geyer, 2015; Moghadam *et al.*, 2022).

En México, en 1991, se documentó un síntoma en plantas de maíz que desarrollaban mazorcas múltiples a partir de la principal, a la que Cruz (1991) llamó "manita del maíz", y Hernández (1993) descartó como enfermedad importante. Aguilar y Molina (1996), determinaron una correlación entre el uso de semillas procedentes de plantas sintomáticas con la incidencia de este problema y descartaron que la aplicación de fungicidas redujera los síntomas. En 2010, en un estudio realizado en Veracruz, México, se reportó el síntoma de producción múltiple de jilotes asociado al fitoplasma "maize bushy stunt" (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2010). Márquez-Diego *et al.* (2021) indicaron que los productores

an important disease. Aguilar and Molina (1996) determined a correlation between the use of seeds from symptomatic plants and the incidence of this condition, ruling out that the application of fungicides could reduce the symptoms. In 2010, in a study carried out in Veracruz, Mexico, the symptom of multiple maize ears was reported in association with the phytoplasma “maize bushy stunt” (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2010). Marquez-Diego *et al.* (2021) indicated that producers call this condition “monkey’s hand” (Figure 1) and determined that plants with this symptom show a decrease in grain yield ranging from 20 and 86%, depending on the germplasm evaluated. Singh and Pooja (2008) also argued that the incidence of this condition depends on the genetic material. Ortiz *et al.* (2022) found that plants with these symptoms lose between 30 and 90% of their grain. The present study aimed to determine the incidence and distribution of maize plants with symptoms of monkey’s hand at different altitudes and for different germplasms used by farmers.

The study was conducted in nine states of the Mexican Republic, including Tlaxcala, Puebla, State of Mexico, Hidalgo, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Chiapas and Jalisco, during the 2021 autumn - winter season. Commercial plots of maize in stage R1 (Ritchie *et al.*, 1986) or later, were selected. Producers were interviewed to learn about the germplasm they had used. In each locality, the geographic coordinates, meters above sea level (masl), genetic material and incidence of the monkey’s hand symptom were determined in 100 plants in each of four rows in the center of the plot. The incidence per plot was estimated from four repetitions of 100 plants in each of the plots, using the formula:

$$I (\%) = n/N * 100$$



**Figure 1. Symptom associated with ‘monkey’s hand’ in maize ears.**

**Figura 1. Síntoma asociado a ‘mano de chango’ en jilote de maíz.**

conocen a este problema como “mano de chango” (Figura 1) y determinaron que plantas con éste síntoma tienen una disminución de rendimiento de grano entre 20 y 86%, dependiendo del material genético utilizado. Singh y Pooja (2008) también sostienen que la incidencia es dependiente del material genético. Ortiz *et al.* (2022) encontraron que plantas con síntomas presentan pérdidas de grano que varían de 30 a 90%. El objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia y distribución de plantas de maíz con síntoma de mano de chango en diferentes altitudes y germoplasma sembrado por los agricultores.

El estudio se realizó en nueve estados de la República Mexicana, incluyendo Tlaxcala, Puebla, Edo. de México, Hidalgo, Veracruz, Morelos,

Where: I=incidence, n= number of plants with symptoms, N= total plants evaluated.

The incidence of the disease was associated with altitude (masl) using the covariance and correlation test. The incidence between native varieties and improved varieties was compared. The differences between the sampled states were compared using the Kruskal-Wallis test due to the abnormality of the data.

In studies carried out in India, Singh and Pooja (2010) reported that the “bouquet ears” disease had increased both in distribution and incidence. This information coincides with reports from farmers about a significant decrease in yield associated with the disease. In Mexico, initial reports described it as a symptom of little economic importance (Cruz, 1991; Hernández, 1993; Aguilar and Molina, 1996). However, Márquez *et al.* (2021) documented losses of up to 86% in plants with symptoms (with variations according to the genetic background) in the Mezquital region, in the state of Hidalgo. The data collected in the present study showed a similar behavior (Table 1). It was observed that, in 72 of the 74 localities sampled in the country, the incidence of symptoms indicated that the monkey’s hand was distributed in all the sampled states. Only the hybrid Aspros Gladiador and the native variety in Tlaxcala and Ciudad Mendoza, Veracruz, respectively, did not show symptoms of deformation.

Elmore and Abendroth (2006), Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) Thomison (2015), Sravani *et al.* (2021), Márquez-Diego *et al.* (2021), and Moghadam *et al.* (2022) reported that the incidence of this disease depends on the germplasm used. In the present study, the native varieties showed a higher incidence of monkey’s hand symptom, with a mean of 12.06a, than the improved varieties, with 7.53b ( $\chi^2 = 0.0367$ ) (Table 2). Variations in incidence were observed in the different states

Oaxaca, Chiapas y Jalisco, durante la época otoño – invierno 2021. Se seleccionaron parcelas comerciales de maíz en etapa R1 (Ritchie *et al.*, 1986) o posterior. Se hicieron entrevistas a los productores para conocer el germoplasma que habían utilizado. En cada localidad se determinaron las coordenadas geográficas, metros sobre el nivel del mar (msnm), material genético e incidencia del síntoma mano de chango en 100 plantas en cada uno de cuatro surcos en la parte central de la parcela. Para estimar la incidencia por parcela se utilizaron las cuatro repeticiones de 100 plantas en cada una de las parcelas usando la fórmula:

$$I (\%) = n/N * 100$$

Donde: I=incidencia, n= cantidad de plantas con síntomas, N= total de plantas evaluadas.

La incidencia de la enfermedad se asoció con la altitud (msnm) mediante la prueba de covarianza y correlación. La incidencia en las variedades nativas se comparó con las variedades mejoradas. Las diferencias entre las entidades federativas muestreadas se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis debido a la anormalidad de los datos.

Singh y Pooja (2010), en estudios realizados en India, indican que la enfermedad “bouquet ears” ha incrementado tanto en distribución como en incidencia. Esta información coincide con reportes de agricultores sobre una importante disminución de rendimiento asociado a la enfermedad. En México, reportes iniciales la colocaban como un síntoma de poca importancia económica (Cruz, 1991; Hernández, 1993; Aguilar y Molina, 1996). Sin embargo, Márquez *et al.* (2021) documentaron pérdidas en la región del Mezquital, en Hidalgo, de hasta 86% en plantas con síntomas que variaban de acuerdo al material genético. Datos colectados en el presente estudio muestran un comportamiento similar (Cuadro 1). Se observó que, en 72 de las 74 localidades muestreadas del país, la incidencia de síntomas indicó que la mano de chango se encuentra distribuida

**Table 1. Incidence of 'monkey's hand' symptoms in maize plants in different locations in Mexico.****Cuadro 1. Incidencia con síntomas de 'mano de chango' en plantas de maíz en diferentes localidades muestreadas en México.**

| Estado   | Localidad                  | Coordenadas                | Msnm | Germoplasma <sup>a</sup> | Incidencia <sup>b</sup> |
|----------|----------------------------|----------------------------|------|--------------------------|-------------------------|
| Tlaxcala | La Venta                   | 19°33'28.2"N 98°42'16.4"W  | 2785 | Nativo morado            | 12.5                    |
|          | La Venta                   | 19°33'56.5"N 98°41'04.2"W  | 2780 | Nativo                   | 13.0                    |
|          | Calpulalpan                | 19°35'05.7"N 98°37'44.9"W  | 2618 | Trébol amarillo          | 0.25                    |
|          | San Felipe Sultepec        | 19°35'19.8"N 98°37'02.2"W  | 2600 | Nativo                   | 11.25                   |
|          | Calpulalpan                | 19°35'35.7"N 98°35'26.2"W  | 2620 | Nativo                   | 4.0                     |
|          | Calpulalpan                | 19°36'30.9"N 98°33'37.8"W  | 2600 | Nativo morado            | 16.5                    |
|          | Tlaxco                     | 19°37'11.3"N 98°07'44.8"W  | 2550 | Local                    | 0.5                     |
|          | Tlaxco                     | 19°36'16.7"N 98°09'10.0"W  | 2500 | Aspros Gladiador         | 0                       |
|          | Tetlán de Solidaridad      | 19°28'35.4"N 98°02'55.5"W  | 2400 | Asgrow H48               | 5.75                    |
| Hidalgo  | Emiliano Zapata            | 19°40'05.8"N 98°33'01.3"W  | 2500 | Nativo                   | 9.5                     |
|          | Tlanalapa                  | 19°49'40.3"N 98°35'26.2"W  | 2450 | Cacahuacintle amarillo   | 21.75                   |
|          | Singuilucan                | 19°56'06.0"N 98°33'34.5"W  | 2580 | Nativo                   | 23.5                    |
|          | Cinta larga                | 20°11'20.7"N 99°13'25.9"W  | 2005 | Nativo                   | 14.0                    |
|          | Cinta larga                | 20°11'20.7"N 99°13'25.9"W  | 2005 | Aspros Hc8               | 16.5                    |
| Puebla   | Chignahuapan               | 19°49'20.9"N 98°01'32.9"W  | 2670 | Nativo                   | 22.0                    |
|          | Chignahuapan               | 19°47'06.4"N 98°02'20.7"W  | 2670 | Nativo                   | 12.75                   |
|          | Camino Chignahuapan-Tlaxco | 19°44'54.8"N 98°03'26.0"W  | 2300 | Asgrow Rinoceronte       | 6.00                    |
|          | San José Chiapa            | 19°14'11.3"N 97°44'52.4"W  | 2380 | Asgrow H48               | 39.75                   |
|          | Sierra de Soltepec         | 19°06'00.9"N 97°40'03.5"W  | 2355 | Nativo                   | 36.25                   |
|          | Cerca de Nicolás Bravo     | 18°40'05.9"N 97°22'15.1"W  | 2620 | Híbrido                  | 3.75                    |
|          | Cañada de Morelos          | 18°44'46.1"N 97°24'59.3"W  | 2323 | Nativo                   | 42.25                   |
|          | Palmar de Bravo            | 18°50'19.0"N 97°31'15.8"W  | 2199 | Nativo                   | 30.0                    |
|          | Ayala                      | 18°46'23.6"N 98°53'48.7"W  | 1147 | Antílope                 | 2.0                     |
| Morelos  | Tlayecac                   | 18°45'24.1"N 98°52'16.7"W  | 1360 | Nativo                   | 7.75                    |
|          | Jantetelco                 | 18°44'33.3"N 98°50'10.4"W  | 1436 | Asgrow Berrendo          | 24.25                   |
|          | Jantetelco                 | 18°43'17.1"N 98°50'58.4"W  | 1430 | Unisem Ares              | 0.75                    |
|          | Yecapixtla                 | 18°53'26.0"N 98°52'51.3"W  | 1500 | Dekalb 2037              | 27.5                    |
|          | Atlahuacán                 | 18°57'47.2"N 98°52'22.2"W  | 1610 | Brevant B3916            | 8.0                     |
|          | Tuxtepec                   | 18°08'29.8"N 96°10'59.9"W  | 20   | Nativo                   | 11.5                    |
|          | Tuxtepec                   | 18°08'06.9"N 96°10'59.9"W  | 35   | Nativo                   | 3.5                     |
|          | San Juan Bautista          | 18°08'04.3"N 96°10'57.5"W  | 20   | Papaloapan               | 4.5                     |
|          | Autlán de Navarro          | 19°45'16.6"N 104°21'43.1"W | 900  | Asgrow 7573              | 2.0                     |
| Jalisco  | Autlán de Navarro          | 19°45'16.6"N 104°21'43.1"W | 900  | Asgrow 7573              | 3.0                     |
|          | Unión de Tula              | 19°58'45.7"N 104°15'40.4"W | 1349 | Asgrow 7573              | 4.25                    |
| Veracruz | Rancho viejo               | 18°47'02.2"N 97°12'22.0"W  | 1260 | Nativo                   | 20.75                   |
|          | Nueva Rosita               | 18°47'47.7"N 97°11'35.6"W  | 1320 | Xalapeño                 | 0.5                     |
|          | Cd. Mendoza                | 18°48'53.9"N 97°10'51.2"W  | 1280 | Nativo                   | 0                       |
|          | Emiliano Zapata            | 18°43'56.2"N 97°16'31.4"W  | 1630 | Poncho                   | 12.5                    |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°09'01.5"N 96°10'29.5"W  | 10   | Nativo                   | 9.25                    |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°08'45.3"N 96°10'31.0"W  | 15   | Nativo                   | 11.5                    |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°08'44.7"N 96°10'27.8"W  | 10   | Nativo                   | 2.25                    |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°08'43.6"N 96°10'29.2"W  | 10   | Nativo                   | 0.25                    |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°08'33.8"N 96°10'30.6"W  | 10   | Papaloapan               | 6.25                    |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°08'44.1"N 96°09'42.6"W  | 20   | Papaloapan               | 10.75                   |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°08'45.0"N 96°09'44.9"W  | 20   | H-520                    | 3.5                     |
|          | Cosamaloapan de Carpio     | 18°09'00.0"N 96°09'45.0"W  | 10   | Nativo                   | 3.75                    |

**Table 1 (Cont.). Incidence of ‘monkey’s hand’ symptoms in maize plants in different locations in Mexico.**  
**Cuadro 1 (Cont.). Incidencia con síntomas de ‘mano de chango’ en plantas de maíz en diferentes localidades muestreados en México.**

| Estado         | Localidad                 | Coordenadas               | Msnm    | Germoplasma <sup>a</sup>       | Incidencia <sup>b</sup> |
|----------------|---------------------------|---------------------------|---------|--------------------------------|-------------------------|
| Chiapas        | Cosamaloapan de Carpio    | 18°08'43.4"N 96°10'33.3"W | 10      | Nativo                         | 5.5                     |
|                | Cosamaloapan de Carpio    | 18°08'43.4"N 96°10'33.3"W | 10      | Nativo                         | 5.5                     |
|                | Cosamaloapan de Carpio    | 18°08'43.4"N 96°10'33.3"W | 10      | Nativo                         | 5.5                     |
|                | Cosamaloapan de Carpio    | 18°08'43.4"N 96°10'33.3"W | 10      | Nativo                         | 5.5                     |
|                | Siltepec                  | 15°27'42.0"N 92°23'29.5"W | 790     | Christian                      | 10.25                   |
|                | Motozintla                | 15°25'22.8"N 92°21'22.9"W | 830     | Dekalb 7500                    | 15.0                    |
|                | Motozintla                | 15°25'33.0"N 92°21'50.9"W | 866     | Pioneer                        | 15.75                   |
|                | Motozintla                | 15°26'06.6"N 92°21'48.8"W | 879     | Nativo                         | 2.25                    |
|                | Siltepec                  | 15°27'26.3"N 92°22'58.5"W | 986     | Híbrido amarillo               | 0.5                     |
|                | Siltepec                  | 15°27'26.3"N 92°22'58.5"W | 986     | Pioneer                        | 1.75                    |
|                | Siltepec                  | 15°27'26.3"N 92°22'58.5"W | 987     | Christian                      | 5.0                     |
|                | Siltepec                  | 15°26'40.5"N 92°22'30.5"W | 1056    | Pioneer                        | 5.0                     |
|                | Montecristo de Guerrero   | 15°39'00.0"N 92°43'12.0"W | 1215    | Nativo                         | 5.5                     |
|                | El Nominado               | 15°36'00.0"N 92°43'12.0"W | 1215    | Pioneer                        | 0.75                    |
|                | El Nominado               | 15°36'00.0"N 92°43'12.0"W | 1223    | Pioneer                        | 16.75                   |
|                | El Nominado               | 15°36'00.0"N 92°43'12.0"W | 1223    | Jarocho                        | 9.75                    |
|                | Motozintla                | 15°23'34.5"N 92°25'50.6"W | 1226    | Nativo                         | 12.75                   |
|                | Motozintla                | 15°23'29.6"N 92°24'18.1"W | 1250    | Nativo                         | 3.5                     |
| Motozintla     | 15°25'11.1"N 92°23'01.9"W | 1343                      | Pioneer | 4.75                           |                         |
| Edo. de México | Colpos                    | 19°28'06.6"N 98°54'03.5"W | 2250    | MO19:15# Bco (Colpos)          | 3.5                     |
|                | Colpos                    | 19°28'06.6"N 98°54'03.5"W | 2250    | MO19:19+2# Bco (Colpos)        | 0.75                    |
|                | Colpos                    | 19°28'06.6"N 98°54'03.5"W | 2250    | MO19:Elvia 3 TSR# Bco (Colpos) | 5.25                    |
|                | Colpos                    | 19°28'06.6"N 98°54'03.5"W | 2250    | MO19:11# Amar. (Colpos)        | 0.5                     |
|                | Colpos                    | 19°28'06.6"N 98°54'03.5"W | 2250    | MO19:CP-Vero1 Bco (Colpos)     | 5.0                     |
|                | Colpos                    | 19°28'06.6"N 98°54'03.5"W | 2250    | MO19:CP Hilda 2 Amar. (Colpos) | 1.0                     |
|                | Chapingo                  | 19°29'30.5"N 98°52'30.7"W | 2250    | Mejorado                       | 7.0                     |
|                | Chapingo                  | 19°29'30.5"N 98°52'30.7"W | 2250    | Mejorado                       | 16.0                    |
|                | Tepetlixpa                | 19°00'57.9"N 98°49'49.8"W | 2330    | Nativo                         | 17.0                    |

<sup>a</sup> According to the interview with the owner of the plot. <sup>b</sup> Average of four replications. / <sup>a</sup> De acuerdo con la entrevista con el dueño de la parcela. <sup>b</sup> Promedio de cuatro repeticiones.

**Table 2. Covariance of altitude variables (masl) and incidence of monkey hand disease in maize.**  
**Cuadro 2. Covarianza de las variables de altitud (msnm) e incidencia de la enfermedad mano de chango en maíz.**

| Variables                                            | R      | p-value | Significancia |
|------------------------------------------------------|--------|---------|---------------|
| Correlación Msnm – incidencia (Spearman) = 0.3038984 | 27.03% | 0.01984 | *             |
| Covarianza: 2716.052                                 |        |         |               |

sampled. The most affected states were: Puebla, with a percentage greater than 24a, Hidalgo (17ab) and Morelos (11.7b). The states with the lowest incidence were Chiapas (7.2b), Tlaxcala (7.0b), Oaxaca (6.5b), Veracruz (6.3b), State of Mexico (6.2b), and Jalisco with 3.0b % (DMS 5 %: 4.537).

The covariance has a positive value (Table 2) and the correlation a percentage of 30.38, indicating a direct correlation. As the altitude of the location increased, the incidence tended to increase (Figure 2).

The results showed that monkey's hand was found in all the states evaluated, with Puebla having the highest incidence (24 %). The native varieties were more susceptible to the disease than the improved ones. The different altitudes of the localities did not influence the incidence of monkey's hand.

en todos los estados muestreados. Solamente el híbrido Aspros Gladiador y la variedad nativa en Tlaxcala y Ciudad Mendoza, Veracruz, respectivamente, no mostraron síntomas de la deformación.

Elmore y Abendroth (2006), Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) Thomison (2015), Sravani *et al.* (2021), Márquez-Diego *et al.* (2021), Moghadam *et al.* (2022) reportaron que la incidencia es dependiente del germoplasma utilizado. En la presente investigación, las variedades nativas presentaron mayor incidencia del síntoma de mano de chango con una media de 12.06a, que las variedades mejoradas con 7.53b ( $\chi^2 = 0.0367$ ) (Cuadro 2). Se observaron variaciones en incidencia en los diferentes estados muestreados. Los estados más afectados fueron: Puebla, con un porcentaje mayor a 24a, Hidalgo (17ab) y Morelos (11.7ab), y los de menor incidencia en Chiapas (7.2b), Tlaxcala (7.0b), Oaxaca (6.5b), Veracruz (6.3b), Estado de México (6.2b) y Jalisco con 3.0b% (DMS 5%: 4.537).

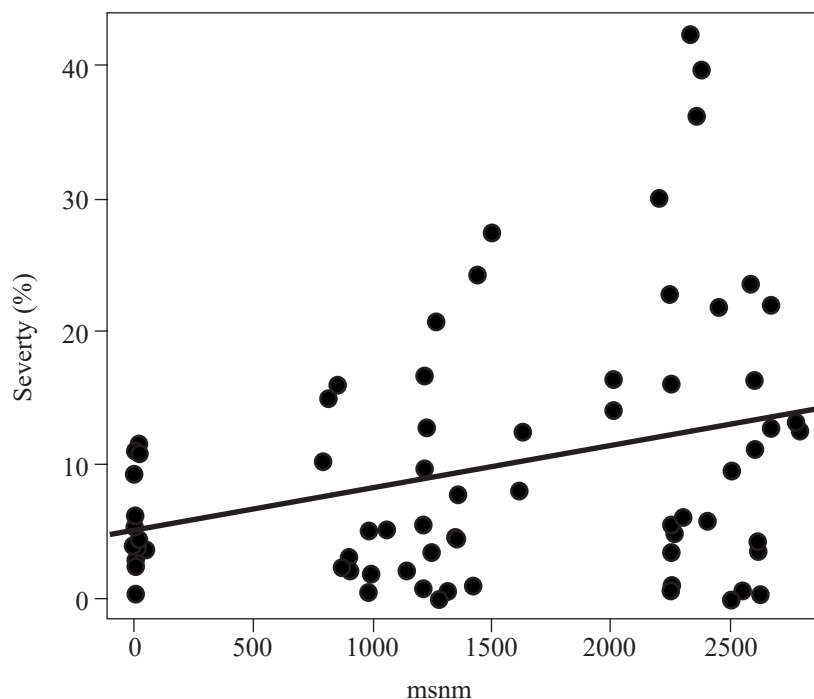


Figure 2. Correlation between the variables of altitude (masl) and the incidence of monkey's hand disease in maize.  
Figura 2. Correlación entre las variables de altitud (msnm) y la incidencia de la enfermedad mano de chango del maíz.



### CITED LITERATURE

- Alcántara-Mendoza S, Téliz-Ortiz D, De León C, Cárdenas-Soriano A y Hernández-Anguiano A. 2010. Detección y evaluación del fitoplasma maize bushy stunt en el estado de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 97: 34–43. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a4.pdf>
- Aguilar RVH and Molina GJD. 1996. Factors influencing the presence of ear prolificacy (“Manita”) in maize. *Agrociencia* 30: 569–572.
- Bonnet OT. 1966. Inflorescences of Maize, Wheat, Rye, Barley and Oats: Their Initiation and Development. Univ. of Illinois, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. Bulletin 721. <http://hdl.handle.net/2142/27945>
- CEDRSSA, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. 2019. Producción de granos básicos y suficiencia alimentaria 2019–2024. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/39ProduccionGranosBásicos.pdf>
- Ciampitti I. 2014. Abnormal Corn Ears. *Infection* 2373: 2373. <https://bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/EP169.pdf>
- CIMMYT. 2019. Maíz Para México. Plan Estratégico 2030. <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/20219/60937.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cruz SPEV. 1991. La proliferación de jilotes en la mazorca (manita) y el rendimiento de maíz (*Zea mays* L.). Tesis profesional de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 61 p.
- Elmore RW and Abendroth LJ. 2006. Multiple ears per node. Iowa State University Agronomy Extension Corn Production. <https://crops.extension.iastate.edu/corn/production/management/mid/multiple.html>
- GCMA, Grupo Consultor de Mercados Agrícolas. 2022. Comportamiento de comercio exterior de granos y oleaginosas. <https://gcm.com.mx/reportes/comercio-exterior/granos-y-oleaginosas/>
- Hernández AM. 1993. Evaluación de algunos componentes del rendimiento en cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) con proliferación en el nudo de la mazorca (manita) en Chapingo México. Tesis profesional de Licenciatura Universidad Autónoma Chapingo. 59 p
- Márquez-Diego JJ, De León-García de Alba C, Rojas-Martínez RI and Sánchez-Pale JR. 2021. Incidence and Effect on Grain Yield of the “Monkey’s Hand” Disease in 29 Maize Genotypes. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(3): 1–9. [doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-2).
- Moghadam HH, Najafinezhad H and Shirkhani A. 2022. Bouquet ears in maize inbred lines as affected by agronomic factors. *Crop Improvement* 1–17. <https://doi.org/10.1080/15427528.2022.2063776%0ABouquet>
- Nielsen RLB. 1999. What a MESS! Corny news network. Purdue University. <https://www.agry.purdue.edu/ext/corn/news/articles.99/990823b.html>
- Nielsen RLB. 2014. Multiple Ears of Corn on the Same Shank. <http://www.kingcorn.org/news/timeless/MessyEars.html%0AMultiple>.
- Ortiz OA, McMechan AJ, Hoegemeyer T, Rees J, Jackson ZT and Elmore RW. 2022. Abnormal ear development in corn: A field survey. *Agrosystems, Geosciences & Environment* 5(1): 1–12. <https://doi.org/10.1002/agg2.20242>
- La covarianza tiene un valor positivo (Cuadro 2) y la correlación un porcentaje de 30.38, indicando una correlación directa ya que al aumentar la altitud de la localidad existe una tendencia de incremento en la incidencia (Figura 2).
- Los resultados obtenidos mostraron que la mano de chango se encontró en todos los estados evaluados, siendo Puebla el que presentó mayor incidencia (24%) y que las variedades nativas fueron más susceptibles que las mejoradas. Las diferentes altitudes de las localidades no influenciaron la incidencia de la mano de chango.

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

Spatial and temporal distribution of ojo de gallo (*Mycena citricolor*) in coffee plantations of the State of Mexico

Distribución espacial y temporal de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en cafetales del Estado de México

Esther Pino-Miranda, José Francisco Ramírez-Dávila*, Rodolfo Serrato-Cuevas, Jaime Mejía-Carranza, Atenas Tapia-Rodríguez, Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEM. Cerrillo Piedras Blancas s/n km 15 Carr. Toluca - Ixtlahuaca, entronque al Cerrillo, Toluca de Lerdo, México, C.P. 50200, México.

*Corresponding author: jframirez@uaemex.mx.

Received: April 20, 2022.

Accepted: July 07, 2022.

Pino-Miranda E, Ramírez-Dávila JF, Serrato-Cuevas R, Mejía-Carranza J and Tapia-Rodríguez A. 2022. Spatial and temporal distribution of ojo de gallo (*Mycena citricolor*) in coffee plantations of the State of Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 433-446.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2204-2>

First DOI publication: July 27, 2022.

Primera publicación DOI: 27 de Julio, 2022.

Abstract. The eye of the rooster (*Mycena citricolor*) is a disease in the coffee crop that can be more severe during the rainy season due to the favorable conditions that occur during this period. The objective of the study was to determine the spatial distribution and population density of *M. citricolor* in coffee cultivation in the State of Mexico and thus understand the epidemiological process of the disease. The research was carried out in the municipality of Amatepec, State of Mexico.

Resumen. El ojo de gallo (*Mycena citricolor*) es una enfermedad en el cultivo de café que puede ser más severa durante la época de lluvias debido a las condiciones favorables que se presentan durante este período. El objetivo del estudio fue determinar la distribución espacial y densidad poblacional de *M. citricolor*, en cultivo de café en el Estado de México y así comprender el proceso epidemiológico de la enfermedad. La investigación se realizó en el municipio de Amatepec, Estado de México. Los muestreos se realizaron quincenalmente de septiembre 2020 a febrero 2021; seleccionando seis parcelas y 200 cafetos (*Coffe arabica*) variedades Typica y Caturra, al azar por parcela, estos se marcaron y georreferenciaron. Se utilizaron métodos para obtener la distribución espacial de ojo de gallo, mostrando diferentes ajustes de modelos geostatísticos como el gaussiano, esférico y exponencial, estos fueron validados con el método de validación cruzada, mostrando una distribución agregada. La estimación de la superficie infectada

The samplings were carried out fortnightly from September 2020 to February 2021; selecting six plots and 200 coffee trees (*Coffe arabica*) Typica and Caturra varieties, randomly per plot, these were marked and georeferenced. Methods were used to obtain the spatial distribution of the rooster's eye, showing different adjustments of geostatistical models such as Gaussian, spherical and exponential, these were validated with the cross-validation method, showing an aggregate distribution. The estimation of the area infected by *M. citricolor* was obtained using ordinary kriging, revealing the presence of foci of infection within the plots, finding a relationship between density and climatic conditions (temperature, humidity and dew point). A high degree of spatial dependence was also obtained in all samples, indicating a strong correlation between the data. It is concluded that geostatistics is an effective tool to study and forecast this type of disease and give a clearer idea of the epidemiological process of the disease.

Keywords: *Mycena citricolor*, Spatial distribution, Epidemiology

Mexico produces one of the highest quality and most demanded coffee varieties worldwide. It produces around 944 thousand tons of coffee grains each year. The states with the highest production are Chiapas, with 40.8% of the national production, Veracruz with 24.4% and Puebla with 15.5%. Together, these three states produce more than 70% of the national total (SIAP, 2021). The State of Mexico currently has approximately 549 hectares planted with coffee, from which 622 tons of coffee are obtained each year. These plantations are distributed over several municipalities, the most important of which are Amatepec (338.2 hectares

por *M. citricolor* se obtuvo utilizando el krigeado ordinario revelándonos la presencia de focos de infección dentro de las parcelas, encontrándose una relación de la densidad con las condiciones climáticas (temperatura, humedad y punto de rocío). También se obtuvo un alto grado de dependencia espacial en todos los muestreos, lo que indica una fuerte correlación entre los datos. Se concluye que la geostatística es una herramienta eficaz para estudiar y pronosticar este tipo de enfermedad y dar una idea más clara del proceso epidemiológico de la enfermedad.

Palabras claves: *Mycena citricolor*, Distribución espacial, Epidemiología

México produce uno de los cafés (café arábica) con mayor demanda y calidad en el mundo; a nivel nacional se producen alrededor de 944 mil toneladas del grano, los estados con mayor producción son Chiapas que reporta una producción del 40.8%, Veracruz con el 24.4% y Puebla con el 15.5%, estas entidades producen más del 70% del total nacional (SIAP, 2021). Actualmente el Estado de México tiene aproximadamente 549 ha sembradas de café de las cuales se obtiene una producción de 622 toneladas, estas plantaciones se encuentran distribuidas en varios municipios, los más importantes son: Amatepec con una superficie sembrada de 338.2 ha y una producción de 333.2 toneladas, Sultepec y Temascaltepec (SIAP, 2020).

A pesar de la relevancia del café, en México, los agricultores en general enfrentan diversos problemas fitosanitarios durante el proceso de producción del cultivo (SENASICA, 2018). Una de estas dificultades es ojo de gallo ocasionada por el hongo *M. citricolor*, miembro de la Clase Basidiomycete, el principal efecto de la enfermedad es el bajo ren-

and 333.2 tons), Sultepec and Temascaltepec (SIAP, 2020).

Despite their importance, coffee crops in Mexico face various phytosanitary problems (SENASICA, 2018). One of these is “ojo de gallo” (American Leaf Spot), caused by the fungus *M. citricolor*, a member of the Basidiomycetes group of fungi. The main effect of the disease is low production yield due to defoliation (Granados, 2020). The variety *C. arabica* and varieties derived from the Timor Hybrid (TH) have different degrees of susceptibility to the attack of “ojo de gallo”. For example, the Catuaí and Villa Sarchí varieties have greater tolerance to the disease than the varieties of the Catimor group (Santacreo 2001; Avelino *et al.*, 1995).

Rooster’s eye is a very important disease in plantations located over 700 meters above sea level, with shade >46%, ambient humidity >80% and cool temperatures between 19 and 23 °C (CENICAFE, 2011). Studies carried out in El Salvador, Costa Rica and Guatemala have shown that the development of the disease depends on the seasonal fluctuations of rainfall and relative humidity. The incidence of the disease increases in rainy seasons, as does the number of diseased leaves and the number of lesions per leaf (from 1 to 75 lesions) (SENASICA, 2014).

In nature, organisms form aggregations or gradients in response to structural characteristics that depend on biotic and abiotic variables of their habitat. This should be kept in mind to better understand the population dynamics of different organisms and their relationship with the environment (Gomez *et al.*, 2010).

The last important epidemic of rooster’s eye in coffee occurred in Costa Rica in 2010. It was associated with a 12% decrease (around 71,400,000 kg) in the estimated harvest production for the productive year 2010-2011, which meant a loss of

diminution in the production, due to the defoliation (Granados, 2020). The varieties of *C. arabica* and varieties derived from the Hybrid of Timor (HdT) have different degrees of susceptibility to the attack of ojo de gallo; for example, the varieties Catuaí and Villa Sarchí have greater tolerance to the disease, than those of the Catimor group (Santacreo 2001; Avelino *et al.*, 1995).

Ojo de gallo is a very important disease in plantations located above 700 msnm, shade >46%, with humidity in the environment >80% and cool temperatures between 19 and 23 °C (CENICAFE, 2011). Studies carried out in El Salvador, Costa Rica and Guatemala, have demonstrated that the development of the disease depends on the seasonal fluctuations of rainfall and relative humidity. The incidence of the disease is more evident in rainy seasons, the number of diseased leaves and the number of lesions per leaf increases rapidly, from 1 to 75 lesions (SENASICA, 2014).

It is fundamental to recognize that in nature the organisms are found forming aggregations or gradients in response to structural characteristics controlled by biotic and abiotic variables that present the habitats, to contribute to a better understanding of the population dynamics of the organisms and their relationship with the environment (Gómez *et al.*, 2010).

In Costa Rica in 2010 a major epidemic of ojo de gallo in coffee, resulted in a 12% decrease (around 71 400 000 kg) of the estimated harvest production for the productive year (2010-2011), which meant a loss of around \$60 million USD (Granados *et al.*, 2020). In Mexico some plantations have shown an incidence of 30%; and for the case of the State of Mexico this disease is monitored by the Epidemiological and Phytosanitary Monitoring Program (SENASICA, 2017).

around USD \$60 million (Granados *et al.*, 2020). In Mexico, some plantations have shown an incidence of 30%. In the State of Mexico, this disease is monitored by the Phytosanitary Epidemiological Monitoring Program (SENASICA, 2017).

Geostatistics is a set of tools and techniques used to analyze and predict values of a variable that is distributed over space or time in a continuous way. It can be used to study phytosanitary problems. All geostatistical work has three stages; 1. Exploratory data analysis during which sample data are studied without considering their geographical distribution. 2. Structural analysis or study of the spatial continuity of the variables. 3. Predictions or estimates of the variables in non-sample points (Moral, 2004). The present study aimed to collect data of the spatial distribution and population density of *M. citricolor* in coffee crops in the State of Mexico to understand the epidemiological process of the disease.

The research was carried out in the municipality of Amatepec, located in the extreme south of the western part of the State of Mexico. Six plots of Arabica coffee (Typica and Caturra) were selected, with an age of 10 to 20 years and an average area of 5000 m². The shade percentage of the plots ranged between 40 and 60%. The main management activities carried out in each plot were formation pruning, shade regulation and phytosanitary pruning. For the sampling, the plots were delimited and divided into 10x10m quadrants, making a total of 50 quadrants per plot. Four trees were randomly selected from each quadrant, for a total of 200 trees. Each plant was marked and georeferenced using a differential global positioning system (Trimble SPS361) to locate and sample the same plants during the study. In each plant, samplings were performed by stratum (lower, middle and upper), taking four branches from each of them (one for each cardinal point). Three random leaves

La Geoestadística es un conjunto de herramientas y técnicas que sirven para analizar y predecir valores de una variable que se muestra distribuida en el espacio o en el tiempo de una forma continua; utilizando esta herramienta para el estudio de problemas fitosanitarios. Todo trabajo geoestadístico tiene tres etapas; 1. Análisis exploratorio de los datos. Se estudian los datos muestrales sin tener en cuenta su distribución geográfica. 2. Análisis estructural. Estudio de la continuidad espacial de la variable. 3. Predicciones. Estimaciones de la variable en los puntos no muestrales (Moral, 2004). El objetivo del estudio fue recolectar datos que determinaron la distribución espacial y densidad poblacional de *M. citricolor*, en cultivos de café en el Estado de México y así comprender el proceso epidemiológico de la enfermedad.

La investigación se llevó a cabo en el municipio de Amatepec, ubicado en el extremo sur de la porción occidental del Estado de México. Se seleccionaron seis parcelas de café arábico (Typica y Caturra) con una edad de 10 a 20 años, un área promedio de 5000 m²; el porcentaje de sombra de las parcelas fue en un rango de 40-60%. Las principales actividades de manejo desarrolladas en cada parcela fueron: poda de formación, regulación de sombra y podas fitosanitarias. Para el muestreo las parcelas fueron delimitadas y divididas en cuadrantes de 10x10m obteniendo un total de 50 cuadrantes por parcela, de los cuales se tomaron cuatro árboles al azar, para tener un total de 200 árboles. Cada planta fue marcada y georreferenciada mediante un sistema de posicionamiento global diferencial (DGPS), modelo Trimble SPS361; para ubicar y muestrear las mismas plantas durante la investigación. En cada planta los muestreos se realizaron por estrato (bajo, medio y alto) y de cada uno de ellos se seleccionaron cuatro ramas (una por cada punto cardinal); de cada rama se evaluaron tres hojas al azar. La incidencia de ojo de gallo se determinó con

from each branch were evaluated. The incidence of rooster's eye was determined based on the number of leaves that presented symptoms of the disease, compared to the total number of leaves on each branch. The evaluations were carried out every 14 days from September 2020 to February 2021.

The kurtosis and the coefficient of variation of the obtained data were evaluated to verify their normality. Once the database was integrated, a geostatistical analysis was carried out. It began by obtaining the experimental semivariogram of the incidence of the disease found during the study. The experimental semivariograms, which were computed using the Variowin 2.2 software (Springer Verlag, NY) (Maldonado *et al.*, 2017), were adjusted to spherical, Gaussian, exponential, pure nugget effect, logarithmic, monomic and hole-effect theoretical models. The plateau, range and nugget effect parameters of these models were modified manually to mathematically validate the adjusted models using validation statistics such as Mean Estimation Errors (MEE), Mean Square Error (ECM) and Dimensionless Mean Square Error (MCE) (Rivera-Martínez *et al.*, 2017).

The experimental values of the semivariograms were calculated using the following expression (Journel and Huijbregts 1978; Isaaks and Srivastava 1989):

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

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

base al número de hojas que presentaron síntomas de la enfermedad, con respecto al total de hojas en cada rama; las evaluaciones se realizaron cada 14 días de septiembre 2020 a febrero 2021.

A los datos adquiridos se les aplicó los parámetros estadísticos Curtosis y el coeficiente de variación para verificar su normalidad, se detectó normalidad en ellos. Una vez integrada la base de datos, se realizó un análisis geoestadístico, se inició con la obtención del semivariograma experimental a partir de la incidencia recabada en la investigación con el programa Variowin 2.2 (Software for spatial data analysis en 2D. Springer Verlag, NY) (Maldonado *et al.*, 2017). Los semivariogramas experimentales se ajustaron a modelos teóricos, los cuales son esféricos, gaussianos, exponenciales, de efecto pepita puro, logarítmicos, monómicos y de efecto agujero, donde los parámetros de meseta, rango y efecto pepita se modifican manualmente hasta obtener estadísticos de validación que sean adecuados y permitan aprobar matemáticamente los modelos ajustados, tales como la Media de los Errores de Estimación (MEE), Error Cuadrático Medio (ECM) y Error Cuadrático Medio Adimensional (ECMA) (Rivera-Martínez *et al.*, 2017).

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

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

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

The maps were elaborated by interpolating values through ordinary Kriging, an interpolation technique that allows for the unbiased estimation of non-sampled points. Density maps were then prepared with the Surfer 16.0 software (Surface Mapping System). This software was also used to determine the infected surface in the maps to establish where the disease was actually present within the study plots (Rivera-Martínez *et al.*, 2017). The incidence of rooster's eye was associated with climatic conditions such as temperature, relative humidity and dew point, which were determined using a climatic sensor and data logger HOBO ProV2.

Seventy-two semivariograms were calculated in the present study. They showed that the disease rooster's eye had an aggregated spatial distribution that fitted Gaussian and spherical models in most plots, except for plots 1 and 3, for which the semivariograms of February and November fitted an exponential model (Table 1). Martínez *et al.* (2021) described spherical models, which indicate that the populations are present in greater quantity in certain areas of the plot compared to the rest of the sampled points, and that the aggregation centers are random. A Gaussian model indicates that the aggregation behavior occurs continuously within the plots, which means that the fungus disperses to nearby individuals and not to those that are further away. The adjusted parameters that allowed validating the models were the range, which is the degree of correlation between the sampled data; starts at 11,517 ending at 19.84 for the 6 plots. In all models, the nugget effect was equal to zero, which according to Twizeyimana *et al.* (2008) indicates a high level of aggregation of the incidence of the disease, and also that the sample size used in the study was sufficient and the sampling error minimal. In all the samples, there was a high spatial dependence between the

La elaboración de mapas se realizó al utilizar la interpolación de valores a través del krigeado ordinario que es una técnica de interpolación que permite la estimación no sesgada de puntos no muestreados. Una vez obtenido el Krigeado se elaboraron los mapas de densidad con el programa Surfer 16.0 (SurfaceMappingSystem). Finalmente se determinó la superficie infectada para conocer en donde realmente existía la presencia de la enfermedad dentro de las parcelas de estudio, a través de los mapas elaborados, al emplear el programa Surfer 16.0 (SurfaceMappingSystem) (Rivera-Martínez *et al.*, 2017). Se relacionó la incidencia de ojo de gallo con las condiciones climáticas, temperatura, humedad relativa y punto de rocío; obtenidas de sensores climáticos datta loggers HOBO ProV2.

En la investigación se realizaron 72 semivariogramas, los cuales muestran que la enfermedad ojo de gallo presentó una distribución espacial en forma agregada, adecuándose a modelos de tipo gaussiano y esférico en la mayoría de las parcelas; excepto para las parcelas 1 y 3, en los meses de febrero y noviembre correspondientemente, presentaron un modelo de tipo exponencial (Cuadro 1). Martínez *et al.* (2021) describieron modelos de tipo esférico los cuales indica que las poblaciones se presentan en mayor cantidad en ciertas zonas de la parcela respecto al resto de puntos considerados en el muestreo y que los centros de agregación son aleatorios; el modelo gaussiano es indicativo de que el comportamiento de agregación se da de forma continua dentro de las parcelas, indica que el hongo se dispersa a individuos que se encuentren cercanos y no a aquellos más lejanos. Los parámetros ajustados que permitieron validar los modelos, fueron el rango que es el grado de correlación entre los datos muestreados; inicia en 11.517 hasta 19.84 para las seis parcelas. El efecto pepita para todos los modelos, es igual a cero, que de acuerdo con Twizeyimana *et al.* (2008), puede ser explicado

Table 1. Parameters of the semivariogram of the incidence per plot of *Mycena citricolor* between September 2020 and February 2021 in the municipality of Amatepec, State of Mexico.**Cuadro 1. Parámetros del semivariograma de los muestreos por parcela de *Mycena citricolor* de septiembre 2020 a febrero 2021 del municipio de Amatepec, Edo. de México.**

| Muestreo | Media | Varianza | Modelo | Pepita | Meseta | Rango | Pepita/
Meseta | Dependencia
Espacial |
|--------------------|-------|----------|-------------|--------|--------|-------|-------------------|-------------------------|
| Parcela 1 | | | | | | | | |
| Sep-1 ^z | 4.10 | 15.33 | Gaussiano | 0 | 12.64 | 11.52 | 0 | Alta |
| Sep- 2 | 4.22 | 14.41 | Esférico | 0 | 10.95 | 17.92 | 0 | Alta |
| Oct-1 | 4.38 | 14.17 | Gaussiano | 0 | 11.99 | 11.52 | 0 | Alta |
| Oct-2 | 4.19 | 12.97 | Gaussiano | 0 | 10.66 | 10.88 | 0 | Alta |
| Nov-1 | 4.08 | 13.59 | Gaussiano | 0 | 11.06 | 15.36 | 0 | Alta |
| Nov- 2 | 4.06 | 12.19 | Esférico | 0 | 11.05 | 14.08 | 0 | Alta |
| Dic-1 | 3.77 | 11.10 | Esférico | 0 | 9.12 | 17.28 | 0 | Alta |
| Dic-2 | 3.68 | 10.12 | Esférico | 0 | 8.47 | 16.64 | 0 | Alta |
| Ene-1 | 3.54 | 9.88 | Esférico | 0 | 9.20 | 19.84 | 0 | Alta |
| Ene-2 | 3.83 | 9.09 | Gaussiano | 0 | 8.46 | 12.8 | 0 | Alta |
| Feb-1 | 3.63 | 8.70 | Exponencial | 0 | 8.44 | 9.60 | 0 | Alta |
| Feb-2 | 3.48 | 7.38 | Gaussiano | 0 | 7.10 | 13.44 | 0 | Alta |
| Parcela 2 | | | | | | | | |
| Sep-1 | 8.45 | 34.69 | Esférico | 0 | 27.99 | 16.64 | 0 | Alta |
| Sept-2 | 8.43 | 32.86 | Esférico | 0 | 27.39 | 16.00 | 0 | Alta |
| Oct-1 | 8.80 | 30.07 | Esférico | 0 | 25.80 | 10.88 | 0 | Alta |
| Oct-2 | 9.02 | 33.48 | Esférico | 0 | 27.54 | 16.00 | 0 | Alta |
| Nov-1 | 8.56 | 29.43 | Esférico | 0 | 23.51 | 18.07 | 0 | Alta |
| Nov-2 | 8.37 | 27.97 | Esférico | 0 | 23.54 | 15.36 | 0 | Alta |
| Dic-1 | 8.02 | 23.75 | Esférico | 0 | 20.16 | 14.72 | 0 | Alta |
| Dic-2 | 7.79 | 21.33 | Esférico | 0 | 17.60 | 17.28 | 0 | Alta |
| Ene-1 | 7.48 | 17.64 | Esférico | 0 | 15.12 | 14.72 | 0 | Alta |
| Ene-2 | 7.17 | 14.11 | Esférico | 0 | 11.85 | 17.28 | 0 | Alta |
| Feb-1 | 6.95 | 11.61 | Esférico | 0 | 10.08 | 9.60 | 0 | Alta |
| Feb-2 | 6.64 | 9.75 | Esférico | 0 | 8.53 | 16.00 | 0 | Alta |
| Parcela 3 | | | | | | | | |
| Sep-1 | 8.72 | 53.19 | Esférico | 0 | 45.29 | 17.92 | 0 | Alta |
| Sept-2 | 8.97 | 51.49 | Esférico | 0 | 44.72 | 14.72 | 0 | Alta |
| Oct-1 | 8.94 | 48.87 | Esférico | 0 | 43.61 | 14.72 | 0 | Alta |
| Oct-2 | 8.83 | 46.09 | Gaussiano | 0 | 37.72 | 11.52 | 0 | Alta |
| Nov-1 | 8.67 | 44.13 | Esférico | 0 | 36.96 | 15.36 | 0 | Alta |
| Nov-2 | 8.42 | 40.10 | Exponencial | 0 | 38.40 | 10.88 | 0 | Alta |
| Dic-1 | 8.24 | 36.90 | Esférico | 0 | 31.82 | 15.36 | 0 | Alta |
| Dic-2 | 8.06 | 33.92 | Gaussiano | 0 | 29.92 | 10.88 | 0 | Alta |
| Ene-1 | 7.61 | 29.68 | Esférico | 0 | 24.90 | 14.72 | 0 | Alta |
| Ene-2 | 7.23 | 25.32 | Esférico | 0 | 21.84 | 9.60 | 0 | Alta |
| Feb-1 | 6.89 | 21.69 | Esférico | 0 | 17.60 | 10.88 | 0 | Alta |
| Feb-2 | 6.57 | 18.19 | Esférico | 0 | 14.63 | 10.24 | 0 | Alta |
| Parcela 4 | | | | | | | | |
| Sep-1 | 9.77 | 51.70 | Esférico | 0 | 44.72 | 16.38 | 0 | Alta |
| Sept-2 | 9.55 | 45.65 | Esférico | 0 | 39.10 | 9.45 | 0 | Alta |
| Oct-1 | 9.42 | 42.79 | Esférico | 0 | 37.41 | 15.75 | 0 | Alta |
| Oct-2 | 9.27 | 39.47 | Esférico | 0 | 33.85 | 14.49 | 0 | Alta |
| Nov-1 | 9.02 | 35.61 | Esférico | 0 | 30.60 | 10.71 | 0 | Alta |

Table 1. Continues.
Cuadro 1. Continúa.

| Muestreo | Media | Varianza | Modelo | Pepita | Meseta | Rango | Pepita/
Meseta | Dependencia
Espacial |
|-----------|-------|----------|-----------|--------|--------|-------|-------------------|-------------------------|
| Nov-2 | 8.78 | 31.50 | Esférico | 0 | 26.56 | 9.43 | 0 | Alta |
| Dic-1 | 8.50 | 27.92 | Gaussiano | 0 | 24.08 | 8.19 | 0 | Alta |
| Dic-2 | 8.37 | 26.02 | Gaussiano | 0 | 21.58 | 8.19 | 0 | Alta |
| Ene-1 | 8.14 | 23.09 | Esférico | 0 | 20.15 | 9.45 | 0 | Alta |
| Ene-2 | 8.02 | 21.26 | Esférico | 0 | 18.70 | 10.71 | 0 | Alta |
| Feb-1 | 7.90 | 20.20 | Esférico | 0 | 17.43 | 10.08 | 0 | Alta |
| Feb-2 | 7.63 | 17.76 | Esférico | 0 | 16.20 | 15.12 | 0 | Alta |
| Parcela 5 | | | | | | | | |
| Sep-1 | 10.95 | 48.13 | Esférico | 0 | 41.76 | 14.08 | 0 | Alta |
| Sept-2 | 10.80 | 44.57 | Gaussiano | 0 | 39.15 | 10.88 | 0 | Alta |
| Oct-1 | 10.54 | 40.93 | Esférico | 0 | 34.12 | 14.72 | 0 | Alta |
| Oct-2 | 10.24 | 37.19 | Esférico | 0 | 33.44 | 10.24 | 0 | Alta |
| Nov-1 | 10.05 | 34.04 | Esférico | 0 | 28.90 | 14.18 | 0 | Alta |
| Nov-2 | 9.76 | 30.58 | Esférico | 0 | 25.04 | 14.72 | 0 | Alta |
| Dic-1 | 9.35 | 27.25 | Esférico | 0 | 22.96 | 10.88 | 0 | Alta |
| Dic-2 | 9.20 | 26.86 | Esférico | 0 | 22.68 | 8.96 | 0 | Alta |
| Ene-1 | 8.96 | 23.86 | Esférico | 0 | 20.40 | 10.24 | 0 | Alta |
| Ene-2 | 8.71 | 21.19 | Esférico | 0 | 18.26 | 9.60 | 0 | Alta |
| Feb-1 | 8.33 | 18.021 | Esférico | 0 | 15.48 | 8.96 | 0 | Alta |
| Feb-2 | 8.03 | 15.62 | Gaussiano | 0 | 13.44 | 10.88 | 0 | Alta |
| Parcela 6 | | | | | | | | |
| Sep-1 | 11.79 | 49.90 | Gaussiano | 0 | 41.11 | 10.88 | 0 | Alta |
| Sept-2 | 11.39 | 45.10 | Gaussiano | 0 | 39.60 | 10.88 | 0 | Alta |
| Oct-1 | 11.10 | 41.39 | Gaussiano | 0 | 34.44 | 10.88 | 0 | Alta |
| Oct-2 | 10.95 | 38.59 | Gaussiano | 0 | 33.54 | 10.88 | 0 | Alta |
| Nov-1 | 10.62 | 35.29 | Esférico | 0 | 31.65 | 14.09 | 0 | Alta |
| Nov-2 | 10.68 | 34.09 | Esférico | 0 | 28.22 | 14.72 | 0 | Alta |
| Dic-1 | 10.44 | 31.58 | Esférico | 0 | 28.16 | 13.44 | 0 | Alta |
| Dic-2 | 10.04 | 27.67 | Esférico | 0 | 24.36 | 14.72 | 0 | Alta |
| Ene-1 | 9.57 | 23.55 | Esférico | 0 | 21.36 | 10.88 | 0 | Alta |
| Ene-2 | 9.28 | 20.72 | Esférico | 0 | 19.32 | 13.78 | 0 | Alta |
| Feb-1 | 9.01 | 18.33 | Esférico | 0 | 17.10 | 14.08 | 0 | Alta |
| Feb-2 | 8.80 | 17.51 | Esférico | 0 | 16.38 | 14.08 | 0 | Alta |

^z1) First sampling, 2) Second sampling. / ^z1) Primer muestreo, 2) Segundo muestreo.

data, which reflects that the data were associated with each other in a highly significant way (Rossi *et al.*, 1992). The data obtained showed that the aggregation of the incidence of rooster's eye is strongly stable (Maldonado *et al.*, 2017).

como un alto nivel de agregación de la incidencia de la enfermedad, también es un indicativo que el tamaño muestral utilizado en el estudio es suficiente y el error muestral es el mínimo. En todos los muestreos, existe una dependencia espacial alta

In the present study, maps were generated through ordinary kriging to estimate the percentages of infected surface and the values associated with non-sampled points. The 72 maps of the infected surface show the presence of *M. citricolor* in different coffee plots of the municipality of Amatepec (Figure 1). They show that the rooster's eye disease was distributed in central aggregation points, which were constant in all the samplings, indicating that the disease was latently but persistently present in the plots, awaiting the appropriate environmental conditions to spread. In the months of September, October, November and December, the points of aggregation of eye of the rooster were more pronounced but decreased from the month of January. This is due to the decrease of humidity and dew point temperature in the plots during these months (Figure 2). Cardenas *et al.* (2017) pointed out that the semivariograms and the maps generated through Kriging allow to identify foci of infection. They suggest that Geostatistics can explain the spatial arrangement of crop diseases and thus help develop accurate and comprehensive management strategies.

A key element of precision agriculture is the determination of the areas in need of management. For this, it is important to know which areas are infected and the percentage they represent of the total surface (Ramírez and Porcayo, 2009). In the present study, the percentage of infection for the six plots (Table 2) ranged between 64% and 85%. The months from September to December showed higher incidence of infection due to the change in climatic conditions (Figure 2) such as temperature, which averages 20 °C during these months. Campos (2010) mentioned that rooster's eye thrives under relatively cool temperature conditions between 17 and 22 °C, compared to the temperatures required by other fungi that attack coffee plants. Relative humidity was 88% in September, 91% in October,

entre los datos, que nos refleja que los datos están asociados entre sí de una manera altamente significativa (Rossi *et al.*, 1992), con los datos obtenidos se observa que las agregaciones presentadas por ojo de gallo son fuertemente estables (Maldonado *et al.*, 2017).

En este trabajo se generaron mapas a través del krigeado ordinario, para estimar los porcentajes de superficie infectada y los valores asociados a puntos no muestreados. Los 72 mapas obtenidos de la superficie infectada muestran la presencia de *M. citricolor* en las diferentes parcelas del municipio de Amatepec (Figura 1); mostró que ojo de gallo está distribuida en puntos centrales de agregación, los cuales se conservaron durante todos los muestreos, mostrando que la enfermedad está localizada en las parcelas de manera constante y latente que espera las condiciones ambientales adecuadas para incrementar. En los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre se observa que los puntos de agregación de ojo de gallo son más pronunciados y disminuyeron a partir del mes de enero; esto se debió a que la humedad y el punto de rocío presente en las parcelas se reducen en estos meses (Figura 2). Cárdenas *et al.* (2017), señalan que los semivariogramas y los mapas generados a través del krigeado permiten identificar focos de infección de las enfermedades, y, a su vez, sugiere que la Geostatística es una herramienta que puede explicar la disposición espacial que siguen las enfermedades de los cultivos, y de esta manera poder ayudar a tomar decisiones acertadas y oportunas, que ayudan a originar estrategias de manejo integral.

Una de las bases de la agricultura de precisión es determinar las áreas con necesidad de manejo. Para ello es importante conocer las áreas infectadas y el porcentaje que representan del total de la superficie (Ramírez y Porcayo, 2009). El porcentaje de infección para las seis parcelas (Cuadro 2) oscila entre 64% de infección como mínima y el

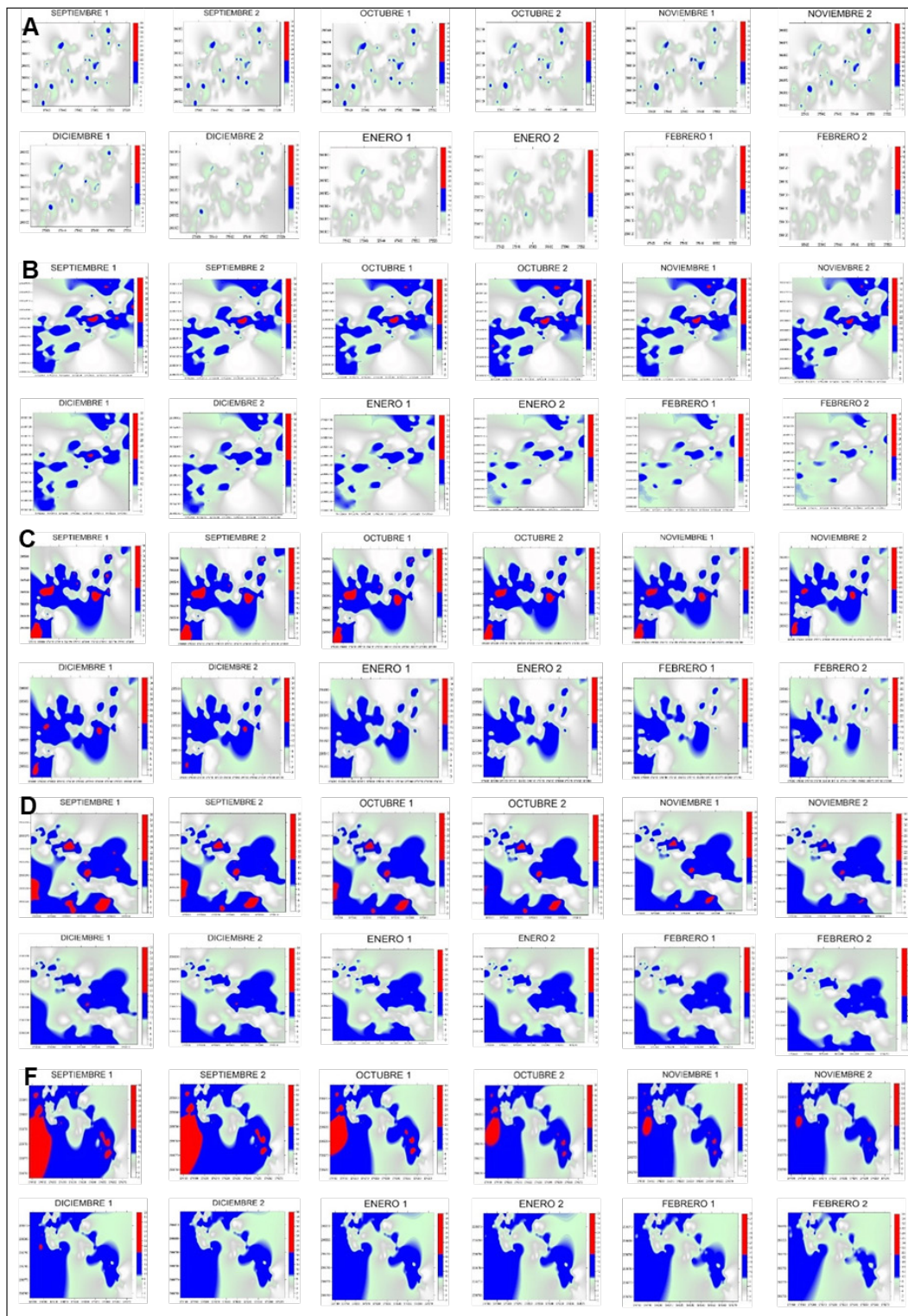


Figure 1. Maps of rooster's eye infection in coffee plantations in the municipality of Amatepec, State of Mexico. (A) plot 1, (B) plot 2, (C) plot 3, (D) plot 4, (E) plot 5 and (F) plot 6.

Figura 1. Mapas de infección de ojo de gallo en cafetales del municipio de Amatepec, Edo. de México. (A) parcela 1, (B) parcela 2, (C) Parcela 3, (D) parcela 4, (E) parcela 5 y (F) parcela 6.

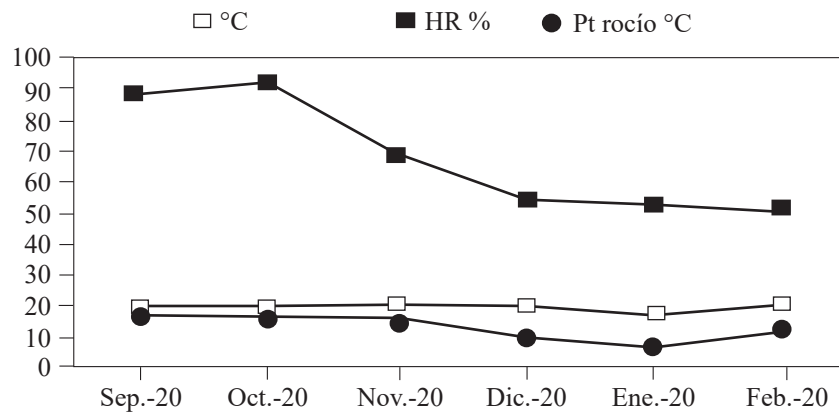


Figure 2. Climatic conditions (Temperature °C, Relative Humidity RH % and Dew Point Dew Point °C) during the evaluation months, from September 2020 to February 2021 in the municipality of Amatepec, State of Mexico.

Figura 2. Condiciones climáticas (Temperatura °C, Humedad relativa HR % y Punto de Rocío Pt Rocío °C) de los meses de evaluación, septiembre 2020 a febrero 2021 en el municipio de Amatepec, Edo. De México.

70% in November and 55% in December, with dew point temperatures of 10.9, 18.6 and 13.9 °C. Granados (2015) mentioned that the development of the epidemic depends on the seasonal fluctuation of rainfall and relative humidity. It is particularly favored by humidity values above 80%. For this reason, the months of September and October have a greater incidence of the disease. Once the rains start, the number of diseased leaves and the number of lesions increase rapidly. The incidence of the disease does not decrease in January and February because the temperature and the dew point remain within suitable ranges. It is worth remembering that a strong dew allows the disease to continue its development, even in a dry period (Waller *et al.*, 2007). The percentage of shade is another of the important parameters since no pruning is carried out in some plots. Rivillas and Castro (2011) mention that coffee cultivation must have a rational distribution of shade, so that it does not affect the availability of light for coffee plants or intercept solar radiation. Shade should not affect the photosynthetic processes of the plant

85% como máxima. Se observa que los meses de septiembre a diciembre tiene mayor incidencia de infección, esto debido a las diferentes condiciones climáticas presentes en el municipio (Figura 2); como fue la temperatura que presentó una media de 20 °C. Campos (2010) menciona, que el ojo de gallo prospera bajo condiciones de temperatura relativamente frescas comprendidas entre 17 – 22 °C, en comparación con la requerida por otros hongos que atacan plantas de café. Por su lado la humedad relativa mostró valores de 88% para septiembre, 91% para octubre, noviembre con 70% y diciembre 55%; finalmente se percibió un punto de rocío 10.9, 18.6 y 13.9 °C. Granados (2015) mencionan que el desarrollo de la epidemia depende de la fluctuación estacional de la lluvia y la humedad relativa, sobre todo de que la humedad se mantenga superior al 80%; por esta razón los meses de septiembre y octubre tienen mayor presencia de infección de la enfermedad. Una vez que las lluvias inician, el número de hojas enfermas y el número de lesiones aumentan rápidamente. Para enero y febrero el porcentaje de la incidencia no disminuyó, esto debido

Table 2. Surface infected with *Mycena citricolor* from September 2020 to February 2021 in the the municipality of Amatepec, State of Mexico.

Cuadro 2. Superficie infectada de *Mycena citricolor* de septiembre del 2020 a febrero del 2021; del municipio de Amatepec, Edo. de México.

| A) | | | B) | | | C) | | |
|----------|------------------------|---------------------------|----------|------------------------|---------------------------|----------|------------------------|---------------------------|
| Muestreo | Superficie infectada % | Superficie no infectada % | Muestreo | Superficie infectada % | Superficie no infectada % | Muestreo | Superficie infectada % | Superficie no infectada % |
| Sep-1 | 68 | 32 | Sep-1 | 74 | 26 | Sep-1 | 76 | 24 |
| Sept-2 | 69 | 31 | Sept-2 | 75 | 25 | Sept-2 | 77 | 23 |
| Oct-1 | 70 | 30 | Oct-1 | 75 | 25 | Oct-1 | 77 | 23 |
| Oct-2 | 70 | 30 | Oct-2 | 75 | 25 | Oct-2 | 77 | 23 |
| Nov-1 | 71 | 29 | Nov-1 | 76 | 24 | Nov-1 | 78 | 22 |
| Nov-2 | 72 | 28 | Nov-2 | 76 | 24 | Nov-2 | 78 | 22 |
| Dic-1 | 67 | 33 | Dic-1 | 75 | 25 | Dic-1 | 78 | 22 |
| Dic-2 | 66 | 34 | Dic-2 | 74 | 26 | Dic-2 | 76 | 24 |
| Ene-1 | 66 | 34 | Ene-1 | 74 | 26 | Ene-1 | 75 | 25 |
| Ene-2 | 65 | 35 | Ene-2 | 73 | 27 | Ene-2 | 75 | 25 |
| Feb-1 | 65 | 35 | Feb-1 | 72 | 28 | Feb-1 | 74 | 26 |
| Feb-2 | 64 | 36 | Feb-2 | 72 | 28 | Feb-2 | 73 | 27 |

| D) | | | E) | | | F) | | |
|----------|------------------------|---------------------------|----------|------------------------|---------------------------|----------|------------------------|---------------------------|
| Muestreo | Superficie infectada % | Superficie no infectada % | Muestreo | Superficie infectada % | Superficie no infectada % | Muestreo | Superficie infectada % | Superficie no infectada % |
| Sep-1 | 77 | 23 | Sep-1 | 84 | 16 | Sep-1 | 75 | 25 |
| Sept-2 | 77 | 23 | Sept-2 | 84 | 16 | Sept-2 | 76 | 24 |
| Oct-1 | 77 | 23 | Oct-1 | 84 | 16 | Oct-1 | 76 | 24 |
| Oct-2 | 78 | 22 | Oct-2 | 85 | 15 | Oct-2 | 76 | 24 |
| Nov-1 | 78 | 22 | Nov-1 | 85 | 15 | Nov-1 | 76 | 24 |
| Nov-2 | 78 | 21 | Nov-2 | 85 | 15 | Nov-2 | 77 | 23 |
| Dic-1 | 77 | 23 | Dic-1 | 83 | 17 | Dic-1 | 75 | 25 |
| Dic-2 | 77 | 23 | Dic-2 | 83 | 17 | Dic-2 | 74 | 26 |
| Ene-1 | 75 | 25 | Ene-1 | 82 | 18 | Ene-1 | 74 | 26 |
| Ene-2 | 75 | 25 | Ene-2 | 82 | 18 | Ene-2 | 74 | 26 |
| Feb-1 | 75 | 25 | Feb-1 | 81 | 19 | Feb-1 | 73 | 27 |
| Feb-2 | 74 | 26 | Feb-2 | 80 | 20 | Feb-2 | 72 | 28 |

or increase the humidity of the crop. But shade modifies the microclimate and increases the number of ecological niches in coffee plantations, which favors the establishment and development of the rooster's eye disease. By reducing the speed of the wind, shading elements can lead to an increase in the relative humidity of the air. The fact that some shading plants are alternate hosts of the pathogen

a que la temperatura y el punto de rocío continuaron entre los rangos permitidos; ya que un fuerte rocío permite que la enfermedad continúe su desarrollo, aun en período seco (Waller *et al.*, 2007). El nivel de sombreado es otro de los parámetros importantes, debido a que en algunas parcelas no se realiza ningún tipo de podas; Rivillas y Castro (2011) mencionan que el cultivo de café debe tener

(Granados, 2015) could explain why the infection surface was larger in some of the plots (4, 5 and 6) evaluated in the present study. Another factor that can help explain the incidence of the disease is the altitude (geographical factor) of the municipality under study, which is 1800 meters above sea level. According to Condori (2021), there is a direct relationship between altitude and incidence of this disease, that is, the incidence is higher in high areas and lower in low areas. Finally, the cultivation of different coffee varieties is an important factor in the incidence of the disease, since some varieties are more vulnerable to attack by rooster's eye (Santacreo, 2001).

In conclusion, the rooster's eye disease in coffee (*C. arabica*) showed a spatial distribution that fitted Gaussian and spherical models. This explains the spatial behavior of *M. citricolor*, which was distributed in aggregates, with some specific aggregation points that did not change in the months sampled, even though they partially decreased due to the changes in climatic conditions. Geostatistics has proven to be one of most effective methods to analyze the spatial distribution of crop diseases, which in turn facilitates making appropriate, pertinent and timely decisions on integrated management.

ACKNOWLEDGMENTS

To the National Council of Science and Technology for the scholarship granted to carry out my Postgraduate studies. To the coffee producers of the municipality of Amatepec for their willingness to collaborate to carry out the present investigation. Special thanks to my parents Adalberto Pino and Audelia Miranda.

CITED LITERATURE

Avelino J, Toledo J y Medina B. 1995. Desarrollo del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en una finca del norte de Guatemala y evaluación de los daños provocados por esta enfermedad.

una distribución racional del sombrío, de manera que este no afecte la disponibilidad de luz para las plantas de café ni intercepte la radiación solar, sin afectar los procesos fotosintéticos de la planta, ni aumentar la humedad del cultivo. La sombra modifica el microclima e incrementa los nichos ecológicos en los cafetales, lo que favorece el establecimiento y desarrollo del ojo de gallo, así también, al disminuir la velocidad del viento, promueve mayor humedad relativa del aire y también el hecho de que algunas especies de sombra son huéspedes alternos del patógeno (Granados, 2015); esto podría explicar por qué en las parcelas (4, 5 y 6) del presente trabajo, la superficie de infección es mayor. Otro factor que podría aclarar la incidencia de la enfermedad es la altitud (factor geográfico) con la que cuenta el municipio, que es de 1800 msnm, que de acuerdo a Condori (2021) cita que existe una relación directa entre altitud e incidencia de esta enfermedad, es decir en zonas altas la incidencia es mayor y en zonas bajas la incidencia es menor. Por último, el uso de variedades de café es una causa importante en la incidencia de la enfermedad, ya que existen variedades más vulnerables al ataque por ojo de gallo (Santacreo, 2001).

En conclusión, la enfermedad ojo de gallo en café (*C. arabica*) presentó una distribución espacial que se ajustó a modelos gaussiano y esférico; que permite explicar un comportamiento espacial en agregados de *M. citricolor*, con algunos puntos de agregación específicos en las parcelas que no se mueven en los meses muestreados, aun que disminuyen parcialmente debido a las condiciones climáticas que se presentan en las áreas muestreadas. La geoestadística ha demostrado ser uno de los métodos utilizados en el sector agrícola para analizar de manera efectiva la distribución espacial de las enfermedades de los cultivos, lo que a su vez facilita la toma de decisiones adecuadas, pertinentes y oportunas sobre el manejo integrado.

- XVI Simposio de Caficultura Latinoamericana. Managua, Nicaragua. 25- 29 de octubre 1993.
- Campo AO. 2010. Manejo integrado del Ojo de gallo *Mycena citricolor*. El cafetal: La revista del caficultor. 31 p
- Cárdenas PNJ, Darghan CAE, Sosa RMD y Rodríguez A. 2017. Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia. Acta Biológica Colombiana 22: 209-220. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.61161>
- CENICAFE. 2011. Ojo de gallo o gotera del cafeto *Omphalia flavida*. Centro Nacional de Investigación de Café (CENICAFE). Chinchiná, Caldas, Colombia.
- Condori CP. 2021. Incidencia de daño de enfermedades asociadas al cultivo del cafeto (*Coffea arabica* L.) en los valles de tambopata y alto Inambari. Universidad Nacional Del Altiplano Facultad de Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica.
- Gómez-Campo K, Rueda M y García-Valencia C. 2010. Distribución espacial, abundancia y relación con características del hábitat del caracol pala eustrombus gigas (linnaeus) (mollusca: Strombidae) en el archipiélago nuestra señora del rosario, caribe colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras 39(1): 137-159. <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2010.39.1.146>
- Granados-Montero MDM, Avelino J, Arauz-Cavallini F, Castro-Tanzi S y Ureña N. 2020. Hojarasca e inóculo de *Mycena citricolor* sobre la epidemia de ojo de gallo. Agronomía Mesoamericana 77-94. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.36614>
- Granados-Montero M. 2015. Estudio de la epidemiología y alternativas de manejo agroecológico del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en cafeto bajo sistemas agroforestales en Costa Rica. 256.
- Isaaks E and Srivastava M. 1988. Spatial continuity measures for probabilistic and deterministic geostatistics. Mathematical Geology 20(4): 313-341. <https://doi.org/10.1007/BF00892982>
- Journel A and Huijbregts CJ. 1978. *Mining geostatistics*. London, United Kingdom: Academic Press.
- Maldonado FI, Ramírez JF, Lara AV, Acosta DA, Rivera R y Rodríguez TA. 2017. Mapeo de la distribución espacial de trips (Insecta: Thysanoptera) en parcelas comerciales de aguacate Var. Hass en Coatepec Harinas, Estado de México. Ecosistemas 26(2): 52-60. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2017.26-2.06>
- Martínez-Martínez N, Ramírez-Dávila JF, Lara-Vázquez F y Figueroa-Figueroa DK. 2021. Distribución espacial de muérdago enano en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca. Colombia Forestal 24(2): 65-81.
- Moral García F. 2004. Aplicación de la geoestadística en las ciencias ambientales: Ecosistemas 13(1). <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/582>
- Ramírez-Dávila J y Porcayo-Camargo E. 2009. Comportamiento espacial de las larvas del mosquito verde *Jacobiasca lybica* en un viñedo de secano en Andalucía, España. CIENCIA Ergo-Sum 16(2): 164-170.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de Posgrado. A los productores de café del municipio de Amatepec por su disposición y colaboración para poder realizar la investigación. Dedicado especialmente a mis padres Adalberto Pino y Audelia Miranda

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

- Rivera-Martínez R, Acosta-Guadarrama AD, Ramírez-Dávila JF, Figueroa-Figueroa DK, Maldonado-Zamora FI y Lara-Díaz AV. 2017. Distribución espacial de las poblaciones de adultos de *Bactericera cockerelli* Sulc. 1 en el cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Southwestern Entomologist 42(4): 1057-1068.
- Rivillas C y Castro A. 2011. Ojo de gallo o gotera del cafeto. Cenicafe 24. [www.cenicafe.org/es/publications/bot037.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/bot037.pdf)
- Rossi, R., J. Mulla, G. Journel, and H. Franz. 1992. Geostatistical tools for modeling and interpreting ecological spatial dependence. Ecol. Monographs 62: 277-314.
- Santacreo R. 2001. Variedades y mejoramiento genético del café. In Manual de caficultura. 3ed. IHCAFE. Tegucigalpa M.D.C., Honduras. p. 23-40. SENASICA. 2014. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 49: 3-8 (consultado marzo 2021, Ojo de gallo *Mycena citricolor* Berkeley & Curtis).
- SENASICA. 2017. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (consultado junio 2020).
- SENASICA. 2018. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <https://www.gob.mx/senasica>. (consultado junio 2021)
- SIAP. 2020. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/fnd/articulos/mexico-y-el-cafe-organico?idiom=es>. (consultado marzo 2021)
- SIAP. 2021. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/667940/Escenario\\_cafe\\_ago21](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/667940/Escenario_cafe_ago21). (consultado marzo 2021)
- Twizeyimana M, Ojiambo PS, Sonder k, Ikotun, T, Hartman GL and Bandyopadhyay R. 2008. Pathogenic variation of *Phakopsora pachyrhizi* infecting soybean in Nigeria. Phytopathology 99: 353-361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0353>.
- Waller JM, Bigger M and Hillocks RJ. 2007. Coffee Pests, Diseases and Their Management. Cabi International Series.434 p.

# ***In vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugar cane to five fungicides**

## **Sensibilidad *in vitro* de *Fusarium sacchari* aislado de caña de azúcar a cinco fungicidas**

**Fabiola Medina-Osti\***, **Adriana Gutiérrez-Díez**, <sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco Villa s/n Colonia Ex Hacienda El Canadá, Gral. Escobedo, Nuevo León CP 66059, México; **Salvador Ochoa-Ascencio**, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Paseo General Lázaro Cárdenas 2290, Colonia Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán, CP 60170, México; <sup>1</sup>**Sugey Ramona Sinagawa-García**.

\*Corresponding author: fameos9@gmail.com

Received: June 02, 2022.

Accepted: July 22, 2022.

Medina-Osti F, Gutiérrez-Díez A, Ochoa-Ascencio S and Sinagawa-García SR. 2022. *In vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugar cane to five fungicides. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 447-457.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-1>

First DOI publication: August 26, 2022.

Primera publicación DOI: 26 de Agosto, 2022.

**Abstract.** The present study had the objective of evaluating the *in vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* to five fungicides of different chemical groups. An isolate of *F. sacchari* obtained from sugarcane plants (*Saccharum officinarum*) with wilt symptoms and identified morphologically and molecularly by the characteristics of the genus *Fusarium* and amplification of the ITS and TEF regions, respectively, was used to evaluate the fungicides azoxystrobin, difenoconazole,

**Resumen.** El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la sensibilidad *in vitro* de *Fusarium sacchari* a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos. Un aislado de *F. sacchari* obtenido de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con síntomas de marchitez e identificado morfológica y molecularmente por las características del género *Fusarium* y amplificación de las regiones ITS y TEF, respectivamente, se utilizó para evaluar los fungicidas azoxystrobin, difenoconazol, hymexazol, cyprodinil y tiabendazol, a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg mL<sup>-1</sup>, empleando la técnica de la placa envenenada. El efecto de los fungicidas y las EC<sub>50</sub> se determinaron por el porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. sacchari* respecto a su crecimiento en las placas sin fungicida. Los fungicidas difenoconazol a 1000 µg mL<sup>-1</sup> y tiabendazol a 100, 1000 y 10 µg mL<sup>-1</sup> fueron estadísticamente iguales y presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (93.5% y 92.1, 91.4 y 89.8%, respectivamente). Los valores EC<sub>50</sub>



hymexazole, cyprodinil and thiabendazole, at concentrations of 1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , using the poison plate technique. The effect of the fungicides and  $\text{EC}_{50}$  was determined by the percentage inhibition of *F. sacchari* growth with respect to the growth on the plates without fungicide. The fungicides difenoconazole at 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and thiabendazole at 100, 1000 and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were statistically equal and presented the highest mycelial growth inhibition percentages (93.5 and 92.1, 91.4 and 89.8 %, respectively). The lowest  $\text{EC}_{50}$  values were presented by difenoconazole (9.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), thiabendazole (9.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and cyprodinil (10.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). In conclusion, *F. sacchari* presented higher *in vitro* sensitivity to the fungicides difenoconazole (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and thiabendazole (100, 1000 and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Keywords:** Pokkah boeng, sugarcane, inhibition,  $\text{EC}_{50}$ .

Sugar cane (*Saccharum officinarum*) is one of the most important industrial crops in Mexico with a national annual production of 5.7 million tons of sugar. Sugarcane fields are distributed in seven strategic regions. The state of San Luis Potosí belongs to the Northwest region, which produces 1156265 tons each year (CONADESUCA, 2021). In 2021, in the municipality of Tamasopo, which belongs to the Huasteca Potosina, 653028 tons of sugar were produced (SIAP, 2022).

Sugarcane wilt or pokkah boeng (PB) is a serious disease that affects the stem of sugarcane plants. The initial symptoms appear in young leaves, which develop chlorotic areas at the base (Vishwakarma *et al.*, 2013). If the infection is limited to the leaves, the plant recovers slowly. In advanced and severe stages, the disease penetrates the stem through a growth point causing upper rot,

más bajos los presentaron difenoconazol (9.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), tiabendazol (9.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y cyprodinil (10.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). En conclusión, *F. sacchari* presentó mayor sensibilidad *in vitro* a los fungicidas difenoconazol (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y tiabendazol (100, 1000 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Palabras clave:** Pokkah boeng, caña de azúcar, inhibición,  $\text{EC}_{50}$ .

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es uno de los principales cultivos industriales en México con una producción nacional de 5.7 millones de toneladas de azúcar. Los campos cañeros se encuentran distribuidos en siete regiones estratégicas; San Luis Potosí pertenece a la región Noroeste que cuenta con una producción de 1,156,265 t (CONADESUCA, 2021). En 2021, en el municipio de Tamasopo perteneciente a la Huasteca Potosina, se produjeron 653,028 t (SIAP, 2022).

La marchitez de la caña de azúcar o pokkah boeng (PB) es una enfermedad grave que afecta el tallo, los síntomas iniciales se observan en hojas jóvenes que desarrollan zonas cloróticas en la base (Vishwakarma *et al.*, 2013). Si la infección queda limitada a las hojas la planta se recupera lentamente, en etapa avanzada y grave la enfermedad penetra el tallo a través de un punto de crecimiento causando pudrición superior, las hojas jóvenes mueren y se desarrollan en el tejido áreas necróticas asimétricas rojizas (Jeyakumar y Zhang, 2020). Esta enfermedad produce pérdidas de 45.2 a 51.2% en la producción del cultivo y de 42.8 a 59.2% en el contenido de jugo de los tallos (Kumar *et al.*, 2015). La calidad del jugo se reduce (Viswanathan, 2020).

Varias especies del género *Fusarium* como *F. sacchari*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Lin *et al.*, 2014; Zhang y Jeyakumar, 2018) han sido identificadas como el agente causal de la enfermedad de

the young leaves die, and reddish asymmetrical necrotic areas appear in the tissue (Jeyakumar and Zhang, 2020). This disease causes losses of 45.2 to 51.2% in crop production and 42.8 to 59.2% in the juice content of the stems (Kumar *et al.*, 2015). The quality of the juice is reduced (Viswanathan, 2020).

Several species of the genus *Fusarium* such as *F. sacchari*, *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (Lin *et al.*, 2014; Zhang and Jeyakumar, 2018) have been identified as causal agents of PB disease (Viswanathan, 2020). They can grow on a wide variety of substrates and have an efficient dissemination mechanism that allows them to spread globally. *Fusarium sacchari* is the main causative agent of PB in India (Viswanathan *et al.*, 2017). According to pathogenicity studies, once it enters the host it causes severe damage to the plant, but its entry mechanism has not been studied in detail (Viswanathan, 2020).

The roots of sugarcane plants become infected in the early stages of crop growth. However, the way in which *F. sacchari* spreads from the roots to the stem is still unknown. Environmental and soil factors probably play a vital role in the development and severity of the disease (Viswanathan, 2020). Species of the genus *Fusarium* inactivate toxic defense substances produced by the host and produce their own toxins, such as enniatins and fusaric acid, which increase their virulence (Agrios, 2005). The present work evaluated the *in vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugarcane with PB symptoms to five fungicides from different chemical groups. The mean effective concentration ( $EC_{50}$ ) of each fungicide was determined.

Using zigzag sampling, 1 m tall sugarcane plants in maturation stage with wilting symptoms were collected between February and April 2019 in nine sugarcane fields (four plants per field) located in Tamasopo (22° 09' 41.0" N 99° 19' 30.4" S) in the Huasteca Potosina region. The 36

PB (Viswanathan, 2020). Estas pueden crecer en una gran variedad de sustratos y tienen un eficiente mecanismo de diseminación que les permite distribuirse globalmente. *Fusarium sacchari* es el principal agente causante de PB en la India (Viswanathan *et al.*, 2017), de acuerdo con estudios de patogenicidad una vez que ingresa al hospedante causa daños severos al cultivo, su mecanismo de entrada al mismo no se ha estudiado en detalle (Viswanathan, 2020).

Las raíces de las plantas de caña de azúcar se infectan en las primeras etapas de crecimiento del cultivo; sin embargo, se desconoce la forma de avance de *F. sacchari* desde las raíces hasta el tallo, probablemente los factores ambientales y de suelo juegan un papel vital en el desarrollo de la enfermedad en los tallos y la severidad con que se presenta (Viswanathan, 2020). Las especies del género *Fusarium* inactivan sustancias tóxicas de defensa producidas por el hospedante, producen toxinas propias que aumentan su virulencia como eniatinas y ácido fusárico (Agrios, 2005). En este trabajo se evaluó la sensibilidad *in vitro* de *Fusarium sacchari* aislado de caña de azúcar con síntomas de PB, a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos y se determinó la concentración media efectiva ( $EC_{50}$ ) para cada uno de los fungicidas.

En febrero y abril de 2019 con base en un muestreo en zigzag se colectaron plantas de caña de azúcar de 1 m de altura en etapa de maduración con síntomas de marchitez en nueve campos cañeros (cuatro plantas por campo) de Tamasopo (22° 09' 41.0" N 99° 19' 30.4" S) en la Huasteca Potosina. Las 36 muestras obtenidas fueron trasladadas en bolsas de papel al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su análisis. Fragmentos de tejido con síntomas de necrosis fueron desinfectados con NaClO al 2% por tres minutos, enjuagados tres veces con agua destilada estéril y secados

samples obtained were transported in paper bags to the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agronomy of the Autonomous University of Nuevo León for analysis. Tissue fragments with necrosis symptoms were disinfected with NaClO (2%) for three minutes, rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile absorbent paper. The tissue was placed in Petri dishes with potato dextrose agar culture medium (PDA-Difco®), which were then incubated at 25±1 °C in the dark for seven days. Two representative isolates (HP1 and HP2) were selected, transferred to PDA culture medium and incubated at 25±1 °C in the dark until spores were formed. Conidia suspensions at a concentration of 1x10<sup>3</sup> were prepared with sterile distilled water and streaked on Petri dishes with PDA culture medium. Isolates from the germinated conidia were purified using the monosporic culture technique.

The monosporic isolates of HP1 and HP2 were morphologically characterized by the color and pigmentation of the colonies. The conidia, phialides and hyphae of *Fusarium* in temporary mounts of lactophenol were characterized using a compound microscope at 40 and 100X (Leslie and Summerell, 2006).

The pathogenicity of the isolates was determined by inoculating a suspension of conidia (1×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>) in stems of sugarcane plants (varieties My 55-14 and Mex 79-431) at harvest stage. The phytopathogen was re-isolated on PDA culture medium from the necrotic tissue of the inoculated stems. For the molecular identification of both isolates, DNA was extracted following the protocol of Cenis (1992), and the ITS (internal transcribed spacer) (White *et al.*, 1990) and TEF (translation elongation factor) regions (O'Donnell *et al.*, 1998; Carbone and Kohn, 1999) were amplified and sequenced for comparison with GenBank sequences and subsequent deposit therein.

en papel absorbente estéril. El tejido fue sembrado en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA-Difco®) que fueron incubadas a 25 ± 1 °C en oscuridad por siete días. Dos aislados representativos (HP1 y HP2) fueron seleccionados y transferidos a medio de cultivo PDA e incubados a 25 ± 1 °C en oscuridad hasta la formación de esporas. Suspensiones de conidios a concentración de 1 x 10<sup>3</sup> fueron preparadas con agua destilada estéril para su siembra por estriado en cajas Petri con medio de cultivo PDA, y a partir de los conidios germinados los aislados se purificaron con la técnica de cultivo monospórico.

La caracterización morfológica de los aislados monospóricos de HP1 y HP2 se realizó por el color y pigmentación de las colonias, así como las características de los conidios, fiálides e hifas en montajes temporales en lactofenol observados a 40 y 100X en microscopio compuesto, de acuerdo con las características del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

La patogenicidad de los aislados se determinó mediante la inoculación de una suspensión de conidios 1×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> en tallos de plantas de caña de azúcar de las variedades My 55-14 y Mex 79-431 en etapa de cosecha, del tejido necrosado de los tallos inoculados se re-aisló el fitopatógeno en medio de cultivo PDA. Para la identificación molecular de ambos aislados se extrajo ADN de acuerdo con el protocolo de Cenis (1992) y se amplificaron y secuenciaron las regiones ITS (internal transcriber spacer) (White *et al.*, 1990) y TEF (translation elongation factor) (O'Donnell *et al.*, 1998; Carbone y Kohn, 1999) para su comparación con secuencias del GenBank y posterior depósito en el mismo.

El aislado monospórico de HP1 se utilizó para determinar la sensibilidad de *F. sacchari* a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos. Concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg mL<sup>-1</sup> de i.a. fueron evaluadas empleando la técnica de placa

The monosporic isolate of HP1 was used to determine the sensitivity of *F. sacchari* to five fungicides from different chemical groups. Concentrations of 1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of a.i. were evaluated using the poisoned plate technique (Dahal and Shrestha, 2018) under a completely randomized experimental design with five replications. Five Petri dishes with PDA culture medium without fungicide (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were used as control. The fungicides evaluated, and the chemical groups to which they belong, were: azoxystrobin (strobilurin, Bankit<sup>®</sup>, Syngenta), difenoconazole (thiazoles, Score<sup>®</sup>, Syngenta), hymexazol (isoxazoles, Tachigaren<sup>®</sup>, Summit Agro), cyprodinil (anilino-pyrimidines, Switch<sup>®</sup>, Syngenta), and thiabendazole (benzimidazoles, Tecto 60<sup>®</sup>).

Mycelium discs (7 mm in diameter) of the isolate HP1 were placed in Petri dishes with modified culture media and control medium for incubation in the dark for seven days at  $25 \pm 1$  °C. During this time, the control treatment filled the dish. Mycelial growth was measured in two perpendicular directions from the center of the colony using a 0.01 mm precision digital caliper (Truper<sup>®</sup>). The percentage of inhibition of radial growth was determined (Dahal and Shrestha, 2018) and a two-way analysis of variance was performed on the results using a linear model, with the linearized values of percentage of inhibition as the dependent variable. The comparison of means was performed by the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ). The  $EC_{50}$  for each fungicide was determined by linear regression of the logarithm of fungicide concentration and the Probit value of growth inhibition (Finney, 1952). All analyzes were performed using the statistical program R version 4.0.1 (R Core Team, 2020).

The morphological characteristics of the colonies, conidia and conidiophores of the MHP1 and MHP2 isolates corresponded to *F. sacchari*,

envenenada (Dahal y Shrestha, 2018) bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Como testigo se utilizaron cinco cajas Petri con medio de cultivo PDA sin fungicida (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los fungicidas evaluados y grupo químico al que pertenecen fueron: azoxystrobin (estrobilurina, Bankit<sup>®</sup>, Syngenta), difenoconazol (tiazoles, Score<sup>®</sup>, Syngenta), hymexazol (isoxazoles, Tachigaren<sup>®</sup>, Summit Agro), cyprodinil (anilino-pirimidinas, Switch<sup>®</sup>, Syngenta) y tiabendazol (benzimidazoles, Tecto 60<sup>®</sup>).

Discos de micelio de 7 mm de diámetro del aislado HP1 se sembraron en las cajas Petri con los medios de cultivo modificados y el testigo para su incubación en oscuridad por siete días a  $25 \pm 1$  °C, en este tiempo el tratamiento testigo llenó la placa. El crecimiento micelial fue medido en dos direcciones perpendiculares a partir del centro de la colonia empleando un calibrador digital de precisión 0.01 mm (Truper<sup>®</sup>). Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (Dahal y Shrestha, 2018) y se realizó el análisis de varianza de dos vías de los resultados utilizando el modelo lineal aplicando como variable dependiente los valores linealizados del porcentaje de inhibición, la comparación de medias se realizó por el método Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Para cada fungicida se determinó la  $EC_{50}$  por regresión lineal del logaritmo de la concentración de fungicida y el valor Probit de inhibición de crecimiento (Finney, 1952). Los análisis se realizaron con el programa estadístico R versión 4.0.1 (R Core Team, 2020).

Las características morfológicas de las colonias, conidios y conidióforos de los aislados MHP1 y MHP2 correspondieron a *F. sacchari* de acuerdo con Leslie y Summerell (2006); la colonia presentó micelio abundante, elevado, blanco pálido, que tornó a violeta a los 14 días de la siembra. Se observaron macroconidios alargados con célula apical curvada y célula basal poco desarrollada con

according to Leslie and Summerell (2006). The colonies presented abundant, aerial, pale white mycelium, which turned purple 14 days after sowing. Elongated macroconidia with curved apical cell and poorly developed basal cell with three septa were observed, as well as abundant microconidia in false heads on monophialides or polyphialides, ovoid and single cell. The sequences obtained in GenBank ON924470 and ON924471 (ITS) showed a similarity of 100% with the sequence of *F. sacchari* with access number MT882327.1, while the sequence ON932086 of (TEF) showed a similarity of 99% with the sequence of *F. sacchari* with access number MT010988.1.

The response of *F. sacchari* to the fungicides and concentrations evaluated showed significant differences (Figure 1). The analysis of variance showed highly significant differences ( $p \leq 0.01$ ) between fungicides and concentrations. The multiple comparison of means of the percentage of growth inhibition formed 12 groups (Table 1). The highest percentage of inhibition was obtained with difenoconazole 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (93.5%) and thiabendazole 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (92.1%), 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (91.4%) and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (89.8%). The rest of the treatments showed percentages of inhibition that ranged from 75.8 to 0%. Various *in vitro* control studies of *Fusarium* species reported that these fungicides had significant growth inhibition effects. Alburqueque and Gusqui (2018) obtained 100% inhibition in *F. oxysporum* isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) and treated with azoxystrobin, carbendazim, copper phosphite and thiabendazole. Dahal and Shrestha (2018) also reported 100% inhibition in *F. oxysporum* treated with carbendazim at 150 and 200 ppm. Madhavi and Bhattiprolu (2011) obtained 92 and 91% inhibition in *F. solani* isolated from chili (*Capsicum annuum*) with the fungicides carbendazim and benomyl, respectively.

tres septos, así como microconidios abundantes en falsas cabezas en monofialides o polifialides, ovoides de una célula. Las secuencias obtenidas en GenBank ON924470 y ON924471 (ITS) presentaron una similitud del 100% con el número de acceso MT882327.1 de *F. sacchari* mientras que la secuencia ON932086 (TEF) mostró similitud del 99% con el número de acceso MT010988.1 de *F. sacchari*.

*F. sacchari* exhibió diferencias significativas a todos los fungicidas y concentraciones evaluados (Figura 1). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre los fungicidas y concentraciones. La comparación múltiple de medias del porcentaje de inhibición de crecimiento formó 12 grupos (Cuadro 1). El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo con difenoconazol 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (93.5%) y tiabendazol 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (92.1%), 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (91.4%) y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (89.8%). El resto de los tratamientos presentaron porcentajes de inhibición de 75.8 a 0%. Diversos estudios de control *in vitro* de especies de *Fusarium* reportan efectos significativos de inhibición de crecimiento con estos fungicidas. Alburqueque y Gusqui (2018) obtuvieron un 100% de inhibición en *F. oxysporum* aislado de jitomate (*Solanum lycopersicum*) tratado con azoxystrobin, carbendazim, fosfito de cobre y tiabendazol, de manera similar Dahal y Shrestha (2018) reportan un 100% de inhibición en *F. oxysporum* tratado con carbendazim a 150 y 200 ppm; mientras que Madhavi y Bhattiprolu (2011) obtuvieron con los fungicidas carbendazim y benomil un 92 y 91% de inhibición en *F. solani* aislado de chile (*Capsicum annuum*), respectivamente.

De acuerdo con los resultados de la presente investigación, se observó que los fungicidas con código G1 (difenoconazol) cuyo modo de acción es de inhibición en la biosíntesis de esteroides con punto de acción en la inhibición de la desmetilación

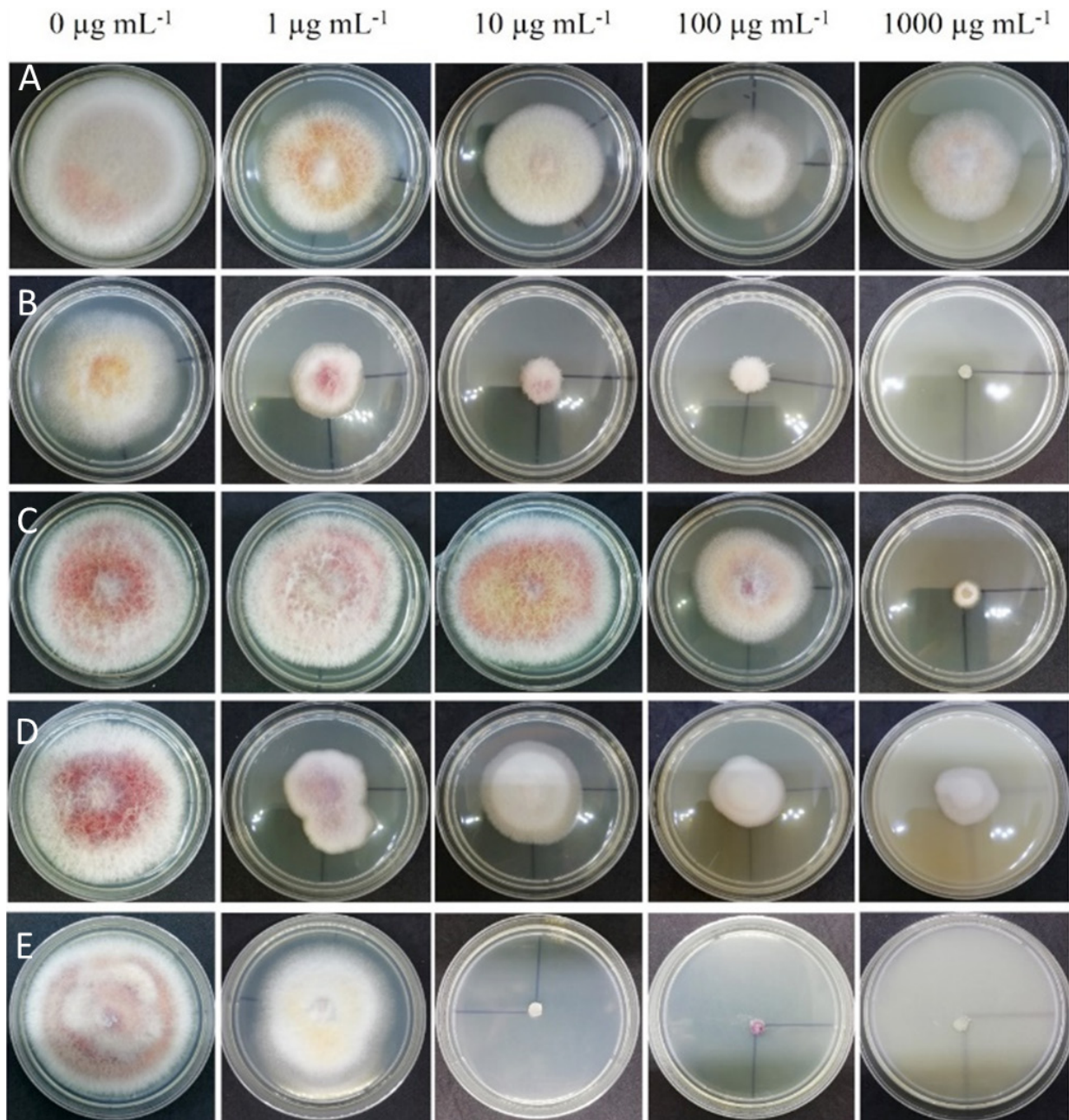


Figure 1. Growth of *Fusarium sacchari* after seven days of exposure to concentrations of 0, 1, 10, 100 and 1000 µg mL<sup>-1</sup> of azoxystrobin A), difenoconazole B), hymexazol C), cyprodinil D), and thiabendazole E).

Figura 1. Crecimiento de *Fusarium sacchari* a los siete días de exposición a concentraciones de 0, 1, 10, 100 y 1000 µg mL<sup>-1</sup> de azoxystrobin A), difenoconazol B), hymexazol C), cyprodinil D) y tiabendazol E).

**Table 1. Mean comparison by Tukey (0.05) of the percentage of inhibition of mycelial growth of *F. sacchari* by the effect of five fungicides at four concentrations.**  
**Cuadro 1. Comparación de medias Tukey (0.05) del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *F. sacchari* por efecto de cinco fungicidas a cuatro concentraciones.**

| Tratamiento                            | Inhibición (%)      | Tratamiento                           | Inhibición (%) |
|----------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------|
| Difenoconazol 1000 µg mL <sup>-1</sup> | 93.5 A <sup>z</sup> | Cyprodinil 1 µg mL <sup>-1</sup>      | 47.3 E         |
| Tiabendazol 100 µg mL <sup>-1</sup>    | 92.1 A              | Azoxystrobin 100 µg mL <sup>-1</sup>  | 31.1 F         |
| Tiabendazol 1000 µg mL <sup>-1</sup>   | 91.4 A              | Hymexazol 100 µg mL <sup>-1</sup>     | 28.3 FG        |
| Tiabendazol 10 µg mL <sup>-1</sup>     | 89.8 A              | Cyprodinil 10 µg mL <sup>-1</sup>     | 27.4 FG        |
| Hymexazol 1000 µg mL <sup>-1</sup>     | 75.8 B              | Azoxystrobin 1000 µg mL <sup>-1</sup> | 26.0 FG        |
| Difenoconazol 100 µg mL <sup>-1</sup>  | 75.1 B              | Azoxystrobin 10 µg mL <sup>-1</sup>   | 18.7 GH        |
| Difenoconazol 10 µg mL <sup>-1</sup>   | 74.7 B              | Azoxystrobin 1 µg mL <sup>-1</sup>    | 13.7 H         |
| Cyprodinil 1000 µg mL <sup>-1</sup>    | 61.8 C              | Tiabendazol 1 µg mL <sup>-1</sup>     | 8.0 HI         |
| Cyprodinil 100 µg mL <sup>-1</sup>     | 60.1 CD             | Hymexazol 1 µg mL <sup>-1</sup>       | 0.3 I          |
| Difenoconazol 1 µg mL <sup>-1</sup>    | 49.3 DE             | Hymexazol 10 µg mL <sup>-1</sup>      | 0.0 I          |

<sup>z</sup>Percentages with the same letter are statistically equal, p≤0.01. / <sup>z</sup>Porcentajes con la misma letra son estadísticamente iguales, p≤0.01.

The results of the present study showed that the fungicides with code G1 (difenoconazole), whose mode of action is inhibition of the biosynthesis of sterols, with point of action in the inhibition of demethylation (FRAC, 2020), and the fungicides with code B1 (thiabendazole), whose mode of action is the inhibition of motor and cytoskeleton proteins, with point of action in the assembly of β-tubulins in mitosis (FRAC, 2020), were the ones that showed the highest inhibition percentage of mycelial growth of *F. sacchari*.

Regarding the EC<sub>50</sub>, the lowest values corresponded to difenoconazole with 1.5 µg mL<sup>-1</sup> (standard error 2.1) and thiabendazole with 7.2 µg mL<sup>-1</sup> (standard error 1.3). Cyprodinil had a value of 36.7 µg mL<sup>-1</sup> (standard error 2.2) and hymexazol a value of 371.0 µg mL<sup>-1</sup> (standard error 1.3), but the highest value corresponded to azoxystrobin, with 18420 µg mL<sup>-1</sup> (standard error 5.2). *F. sacchari* showed growth with all the concentrations of azoxystrobin. Similar results were obtained by Gutierrez *et al.* (2006), who reported that there were no significant differences in inhibition percentage and that isolates of *Fusarium* spp. obtained from

(FRAC, 2020), y código B1 (tiabendazol) cuyo modo de acción es de inhibición de proteínas motoras y del citoesqueleto con punto de acción en el ensamblaje de las β-tubulinas en la mitosis (FRAC, 2020), fueron los que inhibieron en mayor porcentaje el crecimiento micelial de *F. sacchari*.

Respecto a la EC<sub>50</sub> los valores bajos correspondieron a difenoconazol con 1.5 µg mL<sup>-1</sup> (error estándar 2.1) y tiabendazol con 7.2 µg mL<sup>-1</sup> (error estándar 1.3). Cyprodinil presentó un valor de 36.7 µg mL<sup>-1</sup> (error estándar 2.2) e hymexazol un valor de 371.0 µg mL<sup>-1</sup> (error estándar 1.3), mientras que el valor más alto fue para azoxystrobin 18420 µg mL<sup>-1</sup> (error estándar 5.2). *F. sacchari* presentó crecimiento en todas las concentraciones evaluadas con azoxystrobin; resultados similares han sido obtenidos por Gutierrez *et al.* (2006) en donde no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición, así como baja sensibilidad de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de frutos de jitomate hacia dosis de azoxystrobin (3.3, 9.9 y 27.7 µL L<sup>-1</sup> de Quadris, Syngenta).

El tipo de cultivo y enfermedad ocasionada por el fitopatógeno contra el cual se aplica un fungicida

tomato fruits showed low sensitivity to different doses of azoxystrobin (3.3, 9.9 and 27.7  $\mu\text{L L}^{-1}$  from Quadris, Syngenta).

The type of crop and disease caused by a phytopathogen against which a fungicide is applied influences the ability of the latter to inhibit growth. Avonazi *et al.* (2014) obtained an average  $\text{EC}_{50}$  of 0.2  $\text{mg L}^{-1}$  in an assay with *F. graminearum* isolated from wheat (*Triticum aestivum*) exposed to azoxystrobin. This was the most effective fungicide in inhibiting spore germination. In the present study, hymexazol, whose mode of action (A3) plays a role in the metabolism of nucleic acids, affecting DNA/RNA synthesis, and cyprodinil, whose mode of action (D1) affects amino acid and protein synthesis by inhibiting methionine biosynthesis. (FRAC, 2020), showed low percentages of inhibition of the mycelial growth of *F. sacchari* at all the concentrations evaluated, with efficacy values of less than 76%.

Thiabendazole showed an inhibition range of 7.9 to 91.4% and an  $\text{EC}_{50}$  of 7.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . These results demonstrate the antifungal effect of thiabendazole derived from its direct effect on mitosis, preventing the development of the mycelium (Melgarejo and Abella, 2011). Thiabendazole inhibited the mycelial growth of *F. sacchari* at a concentration of 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . This result coincides with that of Kawchuk *et al.* (1994), who performed an *in vitro* study of isolates of *Fusarium* spp. obtained from potato tubers with dry rot symptoms and reported that mycelial growth was inhibited with an  $\text{EC}_{50}$  of 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Gachango *et al.* (2012) obtained an  $\text{EC}_{50}$  of 3.7  $\text{mg L}^{-1}$  with isolates of *Fusarium* spp. also obtained from potato tubers with dry rot. Difenoconazole had an inhibition range of 49.3 to 93.5% with an  $\text{EC}_{50}$  of 1.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . These results coincide with those reported by Gachango *et al.* (2012), who reported 50% mycelial inhibition with an  $\text{EC}_{50}$  of 1.8  $\text{mg L}^{-1}$ . Anderson *et al.* (2020) conducted a

tiene efecto sobre su capacidad para realizar la inhibición en el crecimiento. Avonazi *et al.* (2014) obtuvieron un  $\text{EC}_{50}$  promedio de 0.2  $\text{mg L}^{-1}$  en su ensayo con *F. graminearum* aislado de trigo (*Triticum aestivum*) expuesto a azoxystrobin, siendo este el fungicida con mayor eficacia en la inhibición de la germinación de esporas. En esta investigación el hymexazol cuyo modo de acción (A3) tiene implicación en el metabolismo de ácidos nucleicos afectando la síntesis de ADN/ARN y el cyprodinil cuyo modo de acción (D1) afecta la síntesis de aminoácidos y proteínas al inhibir la biosíntesis de metionina (FRAC, 2020), presentaron bajos porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *F. sacchari* en todas las concentraciones evaluadas, teniendo valores de eficacia menores a 76%.

El tiabendazol presentó un rango de inhibición de 7.9 a 91.4% y una  $\text{EC}_{50}$  de 7.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , estos resultados demuestran el efecto antifúngico del tiabendazol derivado de su efecto directo sobre la mitosis, lo que impide el desarrollo del micelio (Melgarejo y Abella, 2011). Tiabendazol inhibió el crecimiento micelial de *F. sacchari* a partir de la concentración 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , este resultado coincide con lo reportado por Kawchuk *et al.* (1994) en donde en su estudio *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de tubérculos de papa con síntomas de pudrición seca, el crecimiento micelial fue inhibido con una  $\text{EC}_{50}$  de 10  $\text{mg L}^{-1}$ ; por su parte Gachango *et al.* (2012) obtuvieron una  $\text{EC}_{50}$  de 3.7  $\text{mg L}^{-1}$  con aislados de *Fusarium* spp. obtenidos también de tubérculos de papa con pudrición seca. Con difenoconazol se obtuvo un rango de inhibición de 49.3 a 93.5% con una  $\text{EC}_{50}$  de 1.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , estos resultados coinciden con los reportados por Gachango *et al.* (2012) quienes obtuvieron una inhibición micelial del 50% con una  $\text{EC}_{50}$  de 1.8  $\text{mg L}^{-1}$ . Anderson *et al.* (2020) en el estudio de sensibilidad de *F. graminearum* aislado de trigo (*Triticum aestivum*) a fungicidas del grupo de triazoles,



sensitivity study of *F. graminearum* isolated from wheat (*Triticum aestivum*) to fungicides of the triazole group. They obtained an  $EC_{50}$  lower than  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  for both tebuconazole and ketoconazole, which confirmed that the fungicides of the chemical group Triazole are effective in decreasing mycelial growth in *Fusarium* species.

The results obtained in the present study coincide with those of previous works where it was shown that fungicides from various chemical groups such as carbendazim (benzimidazoles, B1), thiophanate methyl (thiophanates, B1), copper oxychloride (inorganic, M01) and mancozeb (dithio carbamates, M03) can be used to control the PB disease (Vishwakarma *et al.*, 2013; Jeyakumar and Zhang, 2020; TNAU, 2020). The first two fungicides have a mode of action similar to thiabendazole with respect to the inhibition of motor and cytoskeleton proteins. The other two fungicides have multisite activity (FRAC, 2020).

*F. sacchari* has been reported as the causal agent of PB disease in different parts of the world (Lin *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2017; Bao *et al.* 2020; Paul *et al.* 2022). In the present study, it was isolated from sugarcane plants found in sugarcane fields of the Huasteca Potosina region. Although the PB disease has not had an economic impact in this region yet, it is a phytosanitary threat. Therefore, it is recommended that future assays include pathogen isolates from different production fields.

obtuvieron una  $EC_{50}$  inferior a  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  tanto para tebuconazol como metoconazol, lo cual confirma que los fungicidas del grupo químico de triazoles son eficaces en la disminución del crecimiento del micelio en especies de *Fusarium*.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con trabajos previos en donde se demuestra que fungicidas de diversos grupos químicos como carbendazim (benzimidazoles, B1), metil tiofanato (tiofanatos, B1), oxiclóruo de cobre (inorgánicos, M01) y mancozeb (ditio carbamatos, M03) ejercen control para combatir la enfermedad de PB (Vishwakarma *et al.*, 2013; Jeyakumar y Zhang, 2020; TNAU, 2020), teniendo los dos primeros fungicidas modo de acción similar a tiabendazol en la inhibición de proteínas motoras y del citoesqueleto y los dos restantes productos químicos con actividad multisitio (FRAC, 2020).

*F. sacchari* ha sido reportada como agente causal de la enfermedad PB en diferentes partes de mundo (Lin *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2017; Bao *et al.* 2020; Paul *et al.* 2022), en esta investigación se aisló de plantas de caña de azúcar de campos cañeros de la Huasteca Potosina; a pesar de que la enfermedad de PB todavía no presenta impactos económicos en esta región, resulta ser una amenaza fitosanitaria, es por ello recomendable para futuros ensayos incluir aislados del patógeno de diferentes campos de producción.

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

CITED LITERATURE

- Agrios GN. 2005. Fitopatología. Segunda edición. Limusa. México. 952p.
- Albuquerque AD y Guisqui MR. 2018. Eficiencia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa* 25:489-498. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Anderson NR, Freije AN, Bergstrom GC, Bradley CA, Cowger C, Faske T, Hollier C, Kleczewski N, Padgett GB, Paul P, Price T and Wise KA. 2020. Sensitivity of *Fusarium graminearum* to metconazole and tebuconazole fungicides before and after widespread use in wheat in the United States. *Plant Health Progress* 21:85-90. <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-11-19-0083-RS>
- Avonazi A, Tonin RB, Reis EM, Camera J and Ranzi C. 2014. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* isolates to fungicides. *Summa Phytopathologica* 40:231-247. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/1891>
- Bao Y, Xu Y, Wang S, Yao Z and Rao GP. 2020. First report of *Fusarium sacchari* that causes sugarcane wilt disease in China. *Plant Disease* 104:2289-2289. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0229-PDN>

- Carbone I and Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Cenis JL. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20: 2380.
- CONADESUCA. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. 2021. 8to Informe Estadístico del Sector Agroindustrial de la Caña de Azúcar en México zafras 2011-2012/2020-2021. http://conadesuca.gob.mx/documentosexternos/8vo_Informe_estadistico.pdf (consulta, julio 2022).
- Dahal N and Shrestha RK. 2018. Evaluation of efficacy of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis in vitro* at Lamjung, Nepal. *Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science* 25:105-112. <http://dx.doi.org/10.3126/jiaas.v35i1.22520>
- Finney DJ. 1952. *Probit Analysis*. Second Edition. Cambridge University Press. New York, USA. 318p.
- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2020. https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2020v2.pdf?sfvrsn=a48499a_2 (consulta, agosto 2021).
- Gachango E, Hanson LE, Rojas A, Hao JJ and Kirk WW. 2012. *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. *Plant Disease* 96:1767-1774. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0932-RE>
- Gutierrez CLJ, Wang Y, Lutton E and McSpadden GBB. 2006. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. *Plant Disease* 90:397-403. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0397>
- Jeyakumar MJM and Zhang M. 2020. Symptoms and their assessment of sugarcane pokkah boeng. *International Journal of Environmental and Agriculture Research* 6(12):50-54.
- Kawchuk LM, Holley JD, Lynch DR and Clear RM. 1994. Resistance to thiabendazole and thiophanate-methyl in Canadian isolates of *Fusarium sambucinum* and *Helminthosporium solani*. *American Potato Journal* 71:185-192.
- Kumar S, Chand G, Mandal D, Kumar A and Kumar S. 2015. Deterioration in sugarcane due to wilt disease. *Ecology, Environment and Conservation Journal* 21:AS145-AS148.
- Leslie JF and Summerell, BA. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. First Edition. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.
- Lin Z, Xu S, Que Y, Wang J, Comstock JC, Wei J, McCord PH, Chen B, Chen R and Zhang M. 2014. Species-specific detection and identification of *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China. *PLoS One* 9:e104195.
- Madhavi GB and Bhattiprolu SL. 2011. Evaluation of fungicides, soil amendment practices and bioagents against *Fusarium solani*-causal agent of wilt disease in chilli. *Journal of Horticultural Sciences* 6:141-144. <https://jhs.iahr.res.in/index.php/jhs/article/view/423>
- Melgarejo GJ y Abella PF. 2011. Fungicidas: mecanismos de acción de los fungicidas. *Revista Ventana al Campo Andino*. (15):193-202. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19031>
- O'Donnell K, Kistler H, Cigelnik E and Ploetz R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:2044-2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- Paul SK, Mahmud NU, Gupta DR, Alam MN, Chakraborty M and Islam MT. 2022. First report of *Fusarium sacchari* causing sugarcane wilt in Bangladesch. *Plant Disease* 106:319-319. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0681-PDN>
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/SIAP>. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. Anuario estadístico de la producción agrícola 2021. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consulta, julio 2022).
- TNAU. Tamil Nadu Agricultural University. 2020. Agritech Portal. Sugarcane. https://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/sugarcane_diseases/sugarcane_d4.html (consulta, agosto 2020).
- Vishwakarma SK, Kumar P, Nigam A, Singh A and Kumar A. 2013. Pokkah boeng: an emerging disease of sugarcane. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4:1-5. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000170>
- Viswanathan R, Balaji CG, Selvakumar R, Malathi P, Ramesh Sundar SA, Naveen Prasanth C, Chabra ML and Parameswari B. 2017. Epidemiology of *Fusarium* diseases in sugarcane: a new discovery of same *Fusarium sacchari* causing two distinct diseases, wilt and pokkah boeng. *Sugar Tech* 19:638-646. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12355-017-0552-4>
- Viswanathan R. 2020. *Fusarium* diseases affecting sugarcane production in India. *Indian Phytopathology* 73:415-424. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00241-y>
- 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*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.) *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press. New York, USA. 482p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang M and Jeyakumar MJM. 2018. *Fusarium* species complex causing pokkah boeng in China. *Fusarium: plant diseases, pathogen diversity, genetic diversity, resistance and molecular markers* 139-154. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73133>.

In vitro and *in vivo* antifungal activity of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* extracts against uredospore germination of *Hemileia vastatrix*

Actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extractos de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* contra la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix*

Ricardo Aguirre-Vega¹, Gerardo Alvarado-Castillo², María del Carmen Ramírez-Benítez¹, José Antonio García-Pérez¹, María de Jesús Hernández-Martínez², Vianey del Rocio Torres-Pelayo^{1*}, ¹Facultad de Biología, ²Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C. P. 91090, Xalapa, Veracruz, México; Enrique Alarcón-Gutiérrez, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101 Col. Emiliano Zapata C. P. 91090 Xalapa, Veracruz, México.

* Corresponding author: vitorres@uv.mx

Received: May 04, 2022.

Accepted: August 09, 2022.

Aguirre-Vega R, Alvarado-Castillo G, Ramírez-Benítez M del C, García-Pérez JA, Hernández-Martínez M de J, Torres-Pelayo V del R and Alarcón-Gutiérrez E. 2022. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* extracts against uredospore germination of *Hemileia vastatrix*. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 458-473.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2205-1>

First DOI publication: August 29, 2022.

Primera publicación DOI: 29 de Agosto, 2022.

Abstract. Coffee (*Coffea arabica*) production is one of the most economically important industrial activities in México. However, coffee production faces phytosanitary problems in the form of coffee rust (*Hemileia vastatrix*). The main goal

Resumen. El café (*Coffea arabica*) es uno de los cultivos industriales y económicos importantes en México; sin embargo, se ha enfrentado a problemas fitosanitarios por *Hemileia vastatrix*. En la actualidad existen alternativas biotecnológicas como lo es el desarrollo de biofungicidas. El objetivo principal fue evaluar la actividad biofungicida de extractos foliares de *Piper auritum* y *Azadirachta indica* sobre *Hemileia vastatrix* a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*. En el ensayo *in vitro*, se aplicaron extractos etanólicos y apolares de *A. indica* y *P. auritum* a concentraciones de 1000, 3000 y 5000 ppm sobre *H. vastatrix*; mientras que en el ensayo *in vivo*, se aplicaron los extractos etanólicos en las hojas de café *Typica* enfermas con *H. vastatrix*. En el ensayo *in vitro*, los extractos de *A. indica* y *P. auritum* inhibieron la germinación de *H. vastatrix* en un 99%. Asimismo, la aplicación del extracto

of the present study was to evaluate extracts from *Azadirachta indica* and *Piper auritum* as potential biofungicides. In *in vitro* assays, ethanolic and non-polar foliar extracts from *A. indica* and *P. auritum* were applied in three concentrations 1000, 3000, and 5000 ppm, against *H. vastatrix*. While in the *in vivo* assay, only ethanolic extracts were applied to coffee plants Typica diseased with *H. vastatrix*. Both extracts inhibited about 99% of the germination of *H. vastatrix* uredospores *in vitro*. On coffee plants of “Typica” variety infected with *H. vastatrix* that were treated with the ethanolic extracts from *P. auritum* and *A. indica*, no disease appeared during the 20 days of treatment. The inhibitory effect was not significantly similar in those treated with copper oxychloride on days 15 and 20 (Tukey $P \leq 0.05$). We suggest that the evaluated plant extracts are used as a natural alternative for the preventive control of *H. vastatrix* in small greenhouses.

Keywords: vegetable extracts, Biofungicide, Coffee rust.

In Mexico, the cultivation of coffee (*Coffea arabica*) is an activity with great economic, social and environmental importance. The state of Veracruz is one of the main coffee producers in terms of surface (around 139 thousand hectares), commercialization volume (SAGARPA, 2015), and number of producers (Pérez and Pérez, 2012). The varieties cultivated include Typica, Garnica, Bourbon, Caturra, among others (López-García *et al.*, 2016). The cultivation of *Coffea arabica* and its varieties is vulnerable to phytosanitary problems that affect grain production and quality. Such is the case of the Typica variety, which is characterized by its tall size, thin trunk and branches widely separated, large leaves with bronze tips, red fruits, acidity, and high quality in the cup due to its

etanólico de *P. auritum* y *A. indica* en hojas de café enfermas, contuvo el incremento de la infección durante los 20 días. Este efecto no fue similar en aquellos tratados con oxiclóruo de cobre en el día 15 y 20 (Tukey $P \leq 0.5$). Sugerimos que los extractos vegetales evaluados podrían ser una alternativa natural para el manejo preventivo de *H. vastatrix*.

Palabras clave: Extractos vegetales, Biofungicida, Roya del café.

En México el cultivo del café (*Coffea arabica*) es una de las actividades principales que conlleva una gran importancia económica, social y ambiental. Tal es el caso del estado de Veracruz, que se mantiene entre los primeros lugares de producción debido a la superficie destinada (alrededor de 139 mil hectáreas), volumen de comercialización (SAGARPA, 2015) y número de productores para su cultivo (Pérez y Pérez, 2012). Específicamente, se cultivan las variedades Typica, Garnica, Bourbon, Caturra, entre otros (López-García *et al.*, 2016). Sin embargo, el cultivo de *Coffea arabica* y sus variedades, son vulnerables a problemas fitosanitarios que afectan la producción de granos y su calidad; como es el caso de la variedad Typica que se caracteriza por un porte alto, tronco y ramas delgadas muy separadas, hojas grandes con puntas de color bronce, frutos de color rojo, acidez y alta calidad en taza, por sus notas a flores y frutas de sabores complejos (Hernández-Solabac *et al.*, 2011; López-García *et al.*, 2016). No obstante, esta variedad es susceptible a plagas y enfermedades, entre las que más predominan y afectan su producción, se encuentra la roya del café, producida por el hongo *Hemileia vastatrix* (Avelino *et al.*, 2015).

Ante este problema fitosanitario, el control químico, a pesar de ser efectivo cuando se usa adecuadamente, conlleva altos costos para los productores,

complex flavors with notes of flowers and fruits (Hernández-Solabac *et al.*, 2011; López-García *et al.*, 2016). This variety is susceptible to pests and diseases. One of the most predominant and harmful in terms of production is coffee rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix* (Avelino *et al.*, 2015).

Chemical control, despite being effective when used properly, entails high costs for producers, and sometimes the production organic coffee must meet official standards that prohibit the use of pesticides (Shigueoka *et al.*, 2014; Silva-Acuña *et al.*, 2002). The use of resistant hybrid varieties of arabica coffee is the most economical and environmentally friendly form of control (FAO, 2015). However, the disease resistance of coffee plants can be affected by the genetic variability of the pathogen, its high evolutionary potential, and the probability of mutation events (Várzea and Marques, 2005). Current initiatives and technological trends promote the development of bio-inputs such as bioinsecticides, bioherbicides, and biofungicides, among others (Ordanza-Beneitez, 2017). These include plant defense stimulants, biological control techniques, and derivatives of natural products obtained from plants and microorganisms (Ordanza-Beneitez, 2017; Mesa *et al.*, 2019). The United States Environmental Protection Agency (EPA) has stated that natural products play an important role in protecting crops under the principles of Integrated Pest and Disease Management (IMPE) (Cantrell *et al.*, 2012; Leahy *et al.*, 2014; Sparks *et al.*, 2017).

This is why these types of alternatives have been used in the cultivation of various crops such as corn and beans, to mention a few. For example, essential oil of neem (*Azadirachta indica*) has been used to control phytopathogenic fungi such as *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Lagenidium giganteum*, *Metarhizium anisopliae*, and *Fusarium graminearum* (Mohamed-Ali *et al.*,

y en ocasiones, el sistema de cultivo orgánico de café tiene estándares oficiales que prohíben el uso de pesticidas (Shigueoka *et al.*, 2014; Silva-Acuña *et al.*, 2002). Mientras que la introducción de híbridos resistentes de la especie arábica, es la forma de control más económica y amigable con el ambiente (FAO, 2015). Sin embargo, la resistencia de la planta puede reducirse debido a la variabilidad genética del patógeno, su alto potencial evolutivo y probabilidad de eventos de mutación (Várzea y Marques, 2005). Actualmente, las nuevas iniciativas y tendencias tecnológicas se están dirigiendo al desarrollo de bioinsumos como bioinsecticidas, bioherbicidas, biofungicidas, entre otros (Ordanza-Beneitez 2017); que incluyen estimulantes de defensas, técnicas de control biológico y derivados de productos naturales obtenidos a partir de plantas y microorganismos (Ordanza-Beneitez 2017; Mesa *et al.*, 2019). Por lo que, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), ha descrito que los productos naturales juegan un papel importante para proteger cultivos bajo el concepto del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) (Cantrell *et al.*, 2012; Leahy *et al.*, 2014; Sparks *et al.*, 2017).

Es por ello, que, en varios sistemas de cultivo como el maíz y frijol, por mencionar algunos, han usado este tipo de alternativas, por ejemplo, el aceite esencial del neem (*Azadirachta indica*) se utilizó para combatir hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Lagenidium giganteum*, *Metarhizium anisopliae* y *Fusarium graminearum* (Mohamed-Ali *et al.*, 2017; Mohammad *et al.*, 2014; Mohanty *et al.*, 2008; Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2016), así como en las urediniosporas de *Phakopsora pachyrhizi*, observándose una reducción del 35% de severidad de la roya asiática de la soya (*Glycine max*) cultivada en invernadero. Asimismo, el extracto de acuyo u hoja santa (*Piper auritum*), ha

2017; Mohammad *et al.*, 2014; Mohanty *et al.*, 2008; Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2016). It has also been used on urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi*, leading to a 35% reduction in the severity of Asian soybean rust (*Glycine max*) under greenhouse conditions. Similarly, the extract of “acuyo” or “hoja santa” (Mexican pepperleaf, *Piper auritum*) has been classified as a biofungicide agent against species of phytopathogenic fungi such as *Helminthosporium* and *Fusarium* spp. (Montes-Belmont, 2009), *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae* (Pineda *et al.*, 2012). The present study evaluated the bio-fungicidal activity of leaf extracts of *Piper auritum* and *A. indica* against *H. vastatrix* using *in vitro* and *in vivo* tests.

Fresh leaves (without mechanical damage and stains) of *A. indica* were collected in Boca del Río, in the state of Veracruz (19° 09' 00.3" N and 96° 07' 32.9" W, 16 masl). Fresh leaves of *P. auritum* were collected in Coatepec, Veracruz (19° 27' 33.3" N and 96° 57' 18.8" W, 1200 masl). All leaves were collected during the spring of 2020. The fresh leaves of both species were rinsed with running water to clean them. The leaves were then crushed, and 10 g of each species were weighed using an analytical balance. The crushed leaf was then placed in a clean container, 100 mL of absolute ethanol were added, and the material was left to stand for 72 h. The same operation was carried out in another container but with an apolar solution (a 1:1 mixture of hexane and chloroform). Afterward, the solutions were poured separately into a funnel with filter paper (Wattman # 2) to obtain ethanolic and apolar extracts. Finally, each extract was placed in a water bath at 45 °C to concentrate the extracts (1g to 900 mg of recovered extract) until the solvent evaporated (modified method of Alvarado-Castillo *et al.*, 2017). The extracts were then stored in a refrigerator at 4 °C for later use in *in vitro* and *in vivo* tests.

sido catalogado como agente biofungicida contra especies de hongos fitopatógenos tales como *Helminthosporium* y *Fusarium* spp. (Montes-Belmont, 2009), *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae* (Pineda *et al.*, 2012). Dado a esta particularidad, en este estudio se evaluó la actividad biofungicida de extractos foliares de *Piper auritum* y *A. indica* sobre *H. vastatrix* a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Se obtuvieron hojas frescas (que no tuvieran daño mecánico y sin manchas) de *A. indica* colectadas en Boca del Río, Veracruz (19° 09' 00.3" N y 96° 07' 32.9" W, 16 msnm) y *P. auritum* colectadas en Coatepec, Veracruz (19° 27' 33.3" N y 96° 57' 18.8" W, 1200 msnm) durante el periodo de primavera del año 2020. Las hojas frescas de ambas especies se enjuagaron con agua corriente para limpiarlas, posteriormente, se trituraron y pesaron 10 g por especie mediante una balanza analítica; estas se colocaron en un recipiente limpio y se agregaron 100 mL de etanol absoluto, se dejó reposar durante 72 h y, en otro recipiente se realizó la misma operación, pero en este caso, se le agregó una solución apolar (una mezcla 1:1 de hexano con cloroformo). Transcurrido este tiempo, las soluciones por separado, se vertieron en un embudo con papel filtro (Wattman # 2) para obtener el extracto etanólico y apolar. Finalmente, cada extracto, se colocó en baño maría a 45°C para concentrar los extractos vegetales (1g a 900 mg de extracto recuperado), hasta evaporar el solvente (método modificado de Alvarado-Castillo *et al.*, 2017). Posteriormente, se guardaron en un refrigerador a 4 °C para su posterior uso en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Las uredosporas de *H. vastatrix* se colectaron de hojas de café arábica *Typica* infectadas de forma natural. La colecta se realizó en los meses de abril-julio del año 2020, en la localidad de Mahuixtlán, Coatepec, Ver., (19° 24' 31.7" N y 96° 55' 37.0" W, 980 msnm); en ese mismo día se llevaron al laboratorio de parasitología de la Facultad de Ciencias

Uredospores of *H. vastatrix* were collected from naturally infected *Typica arabica* coffee leaves. The collection of the leaves was carried out between April and July of 2020, in the town of Mahuixtlán, Coatepec, Veracruz, (19° 24' 31.7" N and 96° 55' 37.0" W, 980 masl). On the same day they were collected, the leaves were taken to the parasitology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Veracruzana in Xalapa, Veracruz, to carry out the *in vitro* test. The effectiveness of the extracts was tested using the method of Alvarado-Castillo *et al.* (2017). For this test, 100 ± 10 uredospores of *H. vastatrix* were placed in a humid chamber and were then treated with extracts of *P. auritum* and *A. indica* in three concentrations, 1000, 3000 and 5000 ppm (1mL of volume), a control of water:ethanol (1:1 v/v) and a blank of Copper Oxychloride (OXIMET®) and wettable powder (50%) (3.0 g/L of water), which was prepared following the instructions of the manufacturer for application to coffee plants. The humid chambers were placed in an incubator at a regulated temperature of 27 °C for five days. The experimental unit was a Petri dish for each treatment, set up in triplicate. The experiment was observed for 5 days because that is the time necessary for the uredospores to germinate and the germinated tubes to appear, which generally occurs after 6 to 12 hours, without the fungus penetrating and carrying out its biological cycle completely (Avelino and Rivas, 2013; Virginio-Filho and Astroga-Domian, 2015).

The *in vitro* germination was observed at 24, 72 and 120 hours using an optical microscope (VELAB™ model VE-B6). The number of germinated spores per treatment was quantified. The germination percentage of each treatment was calculated after five days. The percentage of inhibition was calculated using the following formula: %growth inhibition= [(control growth–

Agrícolas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. Las uredosporas, se colectaron con ayuda de un pincel de punta fina y se depositaron en tubos de 2 mL marca eppendorf, para posteriormente llevar a cabo el ensayo *in vitro*. Se usó el método de Alvarado-Castillo *et al.* (2017) para realizar el ensayo de efectividad de los extractos. Este ensayo consistió en colocar 100 ± 10 uredosporas de *H. vastatrix* en una cámara húmeda, posteriormente se les aplicó el extracto de *P. auritum* y *A. indica* en tres concentraciones, 1000, 3000 y 5000 ppm (1mL de volumen), un testigo a base de agua:etanol (1:1 v/v) y un blanco que fue Oxiclورو de cobre (OXIMET®) 50% polvo humectable (3.0 g/L de agua); se preparó siguiendo las instrucciones del empaque comercial para la aplicación en cafeto. Las cámaras húmedas se colocaron en una incubadora a una temperatura regulada de 27 °C por cinco días, siendo la unidad experimental una caja Petri por cada tratamiento, y se realizó por triplicado. Se consideraron cinco días de observación debido que es el tiempo necesario para observar el inicio de germinación los tubos germinativos de las uredosporas, que generalmente ocurre a partir de las seis a 12 h, sin que esta penetre y lleve a cabo su ciclo biológico totalmente, como el fitoparásito obligado que lo caracteriza (Avelino y Rivas, 2013; Virginio-Filho y Astroga-Domian, 2015).

La observación de germinación *in vitro*, se realizó a las 24, 72 y 120 horas con el apoyo de un microscopio óptico (VELAB™ modelo VE-B6) y se cuantificó el número de esporas germinadas por tratamiento. Transcurridos los cinco días, se obtuvo el porcentaje de germinación por cada tratamiento. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula: % inhibición de crecimiento = [(crecimiento del testigo – crecimiento del tratamiento) / crecimiento del testigo] *100 (Tomado con modificaciones de Polanco-Florian *et al.*, 2020).

treatment growth)/control growth] *100 (Taken with modifications from Polanco-Florián *et al.*, 2020).

The *in vivo* analysis of the effectiveness of the *P. auritum* and *A. indica* extracts was conducted on Typica coffee plants with the presence of *H. vastatrix*. These were obtained from a commercial nursery located in San Marcos de León, Xico, Veracruz. (19° 25' 17.1" N 96° 57' 59.2" W, 1100 masl) during the spring of 2020. The plants were taken to the Faculty of Biology, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz for analysis. The inclusion criteria used to collect the plants were the following: similar size and number of leaves (approximately 11 to 15 leaves), same age (one year), variety, substrate and no previous treatment with fungicides. The coffee plants were grouped into experimental units of 10 individuals. Different treatment groups were formed: control (water), blank (copper oxychloride), ethanolic extracts of *P. auritum* and *A. indica* at three concentrations, 1000, 3000 and 5000ppm. Each treatment had three repetitions. The experimental design was completely randomized. The data were analyzed with an analysis of variance (ANOVA) and the means of each evaluation (24, 72 and 120 h) were compared with a Tukey test ($P \leq 0.05$). The normality of the parameters was checked with the Shapiro-Wilks test. All statistical analyses were performed using the STATISTICA® program for Windows.

All coffee plants were kept under the same greenhouse conditions of temperature, humidity, light incidence, and watering. To induce infection with *H. vastatrix* (previously collected in the town of Mahuixtlán, municipality of Coatepec, Veracruz), around 100 uredospores per square centimeter (previously quantified with the help of a binocular stereoscope VELAB™ VE- S1) were inoculated on the underside of the leaves of

Para el análisis *in vivo* de la efectividad de los extractos de *P. auritum* y *A. indica*, se utilizaron plantas de café variedad Typica con presencia de *H. vastatrix* que se obtuvieron de un vivero comercial ubicado en San Marcos de León, Xico, Ver. (19° 25' 17.1" N 96° 57' 59.2" W, 1100 msnm) durante el periodo de primavera del año 2020. Posteriormente, se llevaron a la facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., para su posterior análisis. Los criterios de selección e inclusión de las plantas fueron el tamaño y número de hojas similares (11 a 15 hojas aproximadamente), misma edad (un año), variedad, sustrato y sin ningún tratamiento previo con fungicidas. Las plantas de café se agruparon por unidad experimental de 10 individuos y se formaron los diferentes grupos por tratamiento: testigo (agua), blanco (oxicloruro de cobre), extracto etanólico de *P. auritum* y *A. indica* a tres concentraciones, 1000, 3000 y 5000 ppm; cada tratamiento con tres repeticiones. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. El análisis de los datos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias de cada evaluación, 24, 72 y 120 h, se realizó con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) y una previa comprobación de los paramétricos de Normalidad mediante prueba de Shapiro-Wilks, utilizando el programa STATISTICA® para Windows.

Todas las plantas de café se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, humedad, incidencia de luz y aplicación de agua, en condiciones de vivero. Para inducir la infección de *H. vastatrix* (previamente colectadas en la localidad de Mahuixtlán, municipio de Coatepec, Ver), se inocularon alrededor de 100 uredosporas por centímetro cuadrado (previamente cuantificadas con la ayuda de un estereoscópico binocular básico (VELAB™ modelo VE-S1) en el envés de las hojas de las plantas de café Typica con la ayuda de un pincel de punta fina. Para observar la infección, se utilizó

Typica coffee plants with the help of a fine-tipped brush. The progress of the infection, including the incubation period (IP) and the latency period (LP), was observed for 20 days using the diagrammatic scale of severity for coffee rust infection (SINAVEF, 2013). It is important to highlight that the first sori were formed during this period, as well as the release of new spores, which confirmed the presence of coffee rust and the beginning of the infection process (Avelino and Rivas, 2013) in 2% of the affected area (Capucho *et al.*, 2011).

The treatments were applied on the underside of the leaves once the first signs of the pathogen were detected (100 mL volume of previously prepared solution) and the progress of the disease was recorded (0, 5, 10, 15 and 20 days after inoculation) (SINAVEF, 2013), that is, during the appearance of new yellow or orange spots on the underside of the leaves, which is one of the indicators of the growth of the disease. The progress of the disease in all the experimental groups was assessed using a diagrammatic scale, according to SINAVEF (2013). Photos of the upper and lower sides of the leaves were taken to classify them according to the diagrammatic scale of disease severity and to record the reactions of *H. vastatrix*, as reported by SINAVEF (2013) and SENASICA (2019). The SINAVEF scale (2013) was used to evaluate the severity of the disease in the leaves.

The data obtained with the diagrammatic scale were transformed into severity percentages using the Townsend and Heuberger formula (Guillén-Sánchez *et al.*, 2017):

$$P = \left(\frac{\sum n \cdot v}{CM \cdot N} \right) * 100 \quad (2)$$

Where,

P - weighted severity average

n - number of leaves for each class in the scale

el criterio de la escala diagramática de severidad de infección de roya del café (SINAVEF, 2013); así como el progreso de la enfermedad durante los 20 días, Período de incubación (PI) y Período de latencia (PL). Es importante resaltar que, durante este periodo, se observó la producción de los primeros soros, liberación de nuevas esporas que confirmaron la presencia de roya e inicio del proceso de infección (Avelino y Rivas, 2013) en un 2% del área afectada para iniciar con el experimento (Capucho *et al.*, 2011).

La aplicación de los tratamientos se realizó en el envés de las hojas, una vez que se detectaron los primeros signos del patógeno (100 mL de volumen de solución previamente preparada), y se registró el avance de la enfermedad (0, 5, 10, 15 y 20 días después de la inoculación) (SINAVEF, 2013), es decir, durante la aparición de nuevas manchas amarillas o anaranjadas en el envés de las hojas, que es uno de los indicativos del incremento de la enfermedad. Se cuantificó el avance de la enfermedad mediante una escala diagramática de acuerdo con SINAVEF (2013), en todos los grupos experimentales. Al mismo tiempo, se tomaron fotos del haz y envés de las hojas para clasificarlas de acuerdo con la escala diagramática de severidad y verificar las reacciones crecientes de *H. vastatrix* como ha sido reportado por SINAVEF (2013) y SENASICA (2019). Para evaluar la severidad en hoja se utilizó la escala de SINAVEF (2013).

Los datos obtenidos con la escala diagramática fueron transformados a porcentajes de severidad, utilizando la fórmula de Townsend y Heuberger (Guillén-Sánchez *et al.*, 2017):

$$P = \left(\frac{\sum n \cdot v}{CM \cdot N} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde,

P - media ponderada de severidad

n - número de hojas por cada clase en la escala

v - numerical value of each class
N - total number of leaves in the sample
CM - major category

The experimental design was completely randomized, with a factorial arrangement of three repetitions. Factor A corresponded to the commercial fungicide and to the three concentrations of plant extracts, while factor B corresponded to the fungus. An analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effect of the treatments. Tukey's comparison of means test was used to evaluate ($P \leq 0.05$) differences, using the STATISTICA® program for Windows.

Figure 1 shows the inhibition effect of all treatments on the germination of *H. vastatrix* uredospores. The ethanolic and apolar extracts of *A. indica* and *P. auritum* inhibited 99% of the germination of *H. vastatrix*. The yellow coloration usually presented by untreated uredospores was not observed. However, the uredospores treated with copper oxychloride did show a yellow coloration, similar to those in the control group (Figure 1 A and C). A gradual increase in uredospore germination was observed in the latter group, from 18 to 99 % between 24, 72 and 120 hours (Figure 2).

The treatments with *A. indica* and *P. auritum*, in particular at concentrations of 3000 ppm and 5000 ppm, caused damage to the uredospores of *H. vastatrix*, as evidenced by the discoloration and deformation observed in the outer structure of the uredospores. The uredospores treated with copper oxychloride remained yellowish and did not germinate. Alvarado *et al.* (2017) mentioned that uredospores that showed discoloration and deformation after being treated with plant extracts could not germinate. Based on the definition of "antifungal" by Gregori-Valdés (2005), they confirmed that the leaf extracts of *A. indica* and *P. auritum* have biofungicidal activity against *H.*

v - valor numérico de cada clase
N - número total de hojas en la muestra
CM - categoría mayor

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar, con arreglo factorial de tres repeticiones. El factor A correspondió al fungicida comercial y a las tres concentraciones de los extractos de plantas y, el factor B al hongo. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto del tratamiento. En los casos donde se encontraron diferencias, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa STATISTICA® para Windows.

En la Figura 1, se observa el efecto de inhibición de la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix* en todos los tratamientos. Los extractos de *A. indica* y *P. auritum*, tanto etanólico como apolar, inhibieron el 99% de la germinación de *H. vastatrix* y no se observó la coloración amarilla que comúnmente presentan las uredosporas sin tratamiento. Mientras que, las uredosporas tratadas con oxiclورو de cobre continuaron con una coloración amarilla similar a las del grupo testigo (Figura 1 A y C). En el grupo testigo, se observó un incremento paulatino de germinación de las uredosporas, del 18% al 99% durante las 24, 72 y 120 horas (Figura 2).

El efecto de los tratamientos de *A. indica* y *P. auritum*, en particular la concentración de 3000 ppm y 5000 ppm, promovieron un daño sobre las uredosporas de *H. vastatrix*; debido que se observaron uredosporas decoloradas y deformadas en parte de la estructura exterior de la uredosporas, mientras que las uredosporas que recibieron oxiclورو de cobre permanecieron amarillentas y no germinaron. De acuerdo con Alvarado *et al.* (2017), mencionaron que las uredosporas dañadas en la parte exterior del hongo y despigmentadas, no tienen capacidad para germinar después del tratamiento con extractos vegetales, y considerando la definición del

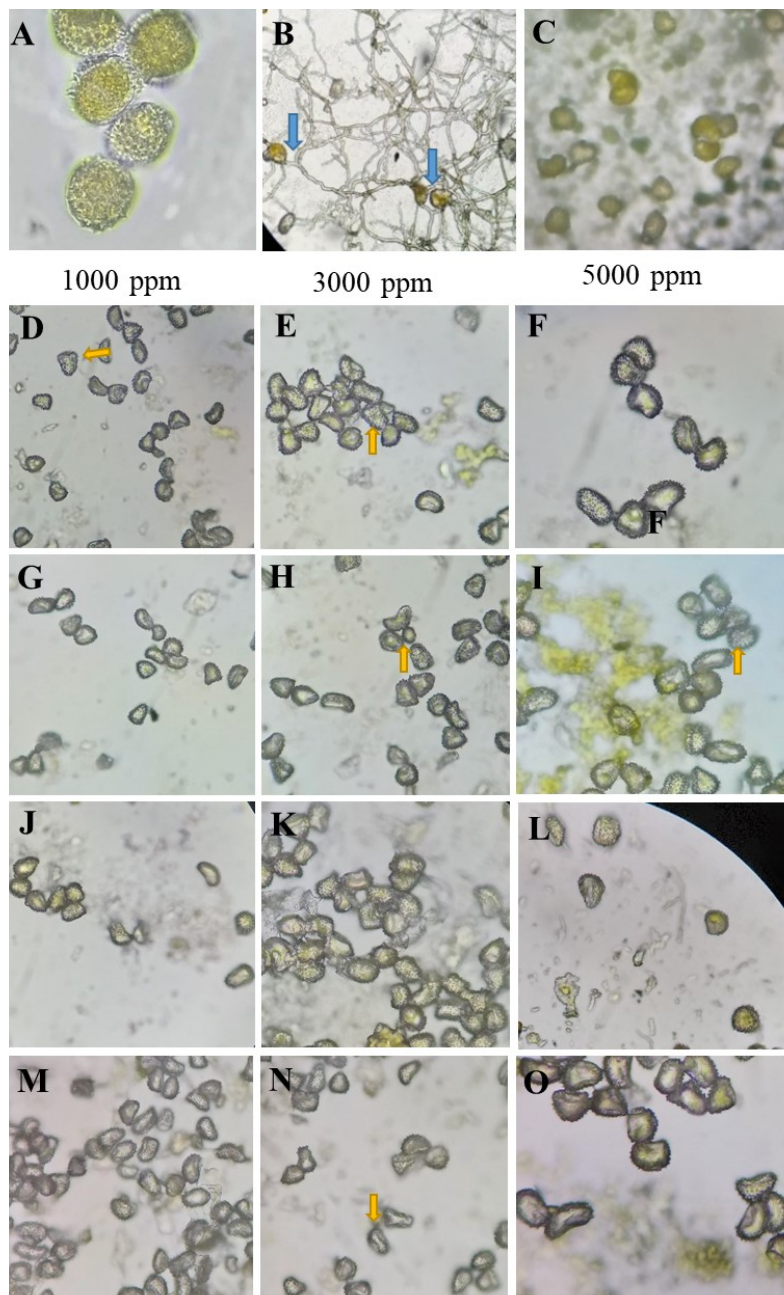


Figure 1. Effect of plant extracts on *Hemileia vastatrix* uredospores. A) *H. vastatrix* uredospores without treatment; B) Control; the blue arrow shows the germ tubes of *H. vastatrix*. C) Blank (Copper oxychloride) inhibits the germination of *H. vastatrix*. D-F) Ethanolic extract of *A. indica*; G-I) Apolar extract of *A. indica*; J-L) Ethanolic extract of *P. auritum*; M-O) Apolar extract of *P. auritum* (40X); the yellow arrows indicate decoloration of *H. vastatrix* and absence of germination.

Figura 1. Efecto de extractos vegetales en uredosporas de *Hemileia vastatrix*. A) Uredosporas de *H. vastatrix* sin tratamiento; B) Testigo, la flecha de color azul muestra los tubos germinativos de *H. vastatrix*. C) Blanco (Oxicloruro de cobre) inhibe la germinación de *H. vastatrix*. D-F) Extracto *A. indica* etanólico; G-I) extracto *A. indica* apolar; J-L) Extracto *P. auritum* etanólico; M-O) extracto *P. auritum* apolar (40X), las flechas amarillas señalan despigmentación de *H. vastatrix* y sin germinación.

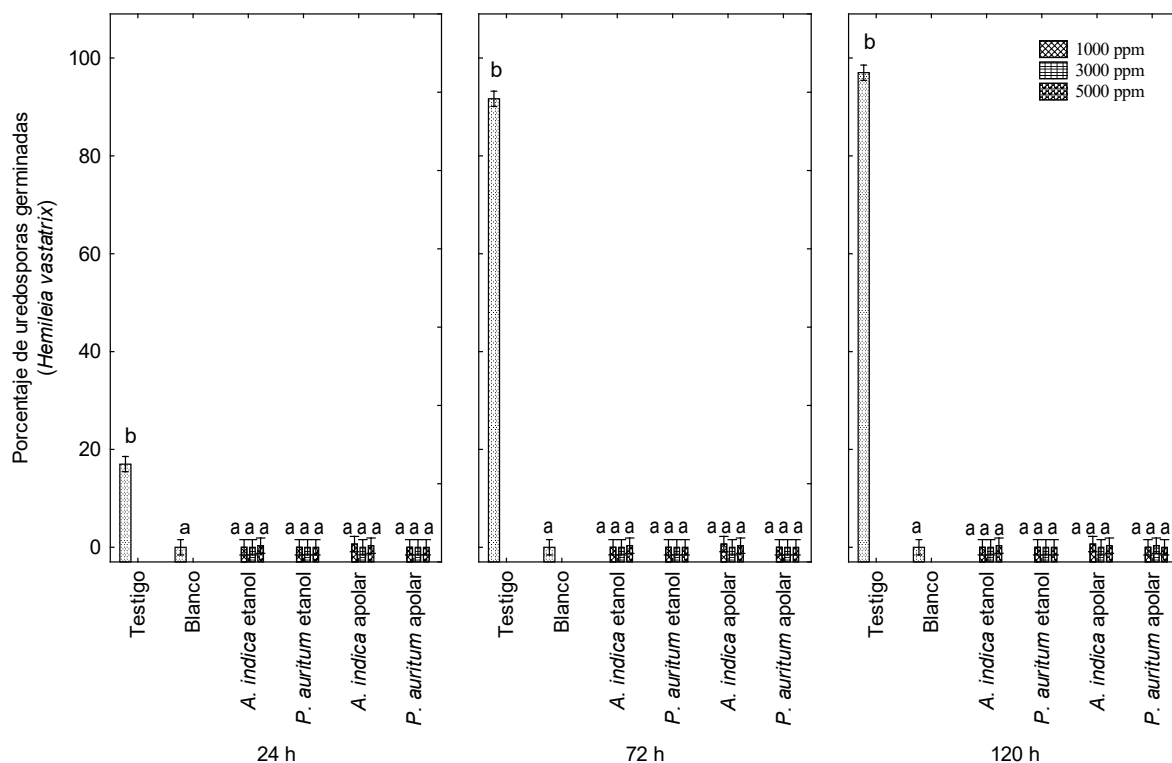


Figure 2. Germination percentage of *Hemileia vastatrix* uredospores under the action of ethanolic and apolar extracts of *Piper auritum* and *Azadirachta indica*, and copper oxychloride (Blank) at 24 h, 72 h and 120 h of exposure. Letters indicate significant differences between means (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 2. Porcentaje de germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix* ante la acción de extractos etanólicos y apolares de *Piper auritum* y *Azadirachta indica*, y oxiclورو de cobre (Blanco) durante las 24 h, 72 h y 120 h de exposición. Las letras indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $P \leq 0.05$).

vastatrix uredospores. Both extracts evaluated in the present study might have partially altered the external structures of *H. vastatrix* uredospores, or simply altered their viability or survival capacity, either directly or indirectly, as described by Gregorí-Valdés (2005).

The harmful effects of the coffee plant extracts on uredospores could be due to the presence of secondary metabolites with biofungicidal activity in *P. auritum*, such as monoterpenoids, sesquiterpenoids, and phenylpropanoids; or to the presence of phenolic metabolites such as alkaloids and glycosides in *A. indica* (Mohammad *et al.*,

concepto “antifúngico de Gregorí-Valdés (2005)”, comprueba que los extractos foliares de *A. indica* y *P. auritum* tienen actividad biofungicida contra las uredosporas de *H. vastatrix*. Ambos extractos implementados en este estudio, podrían estar alterando parcialmente las estructuras externas, o simplemente, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien sea directa o indirectamente como los describe Gregorí-Valdés (2005).

El efecto dañino de los extractos sobre las uredosporas podría deberse a la presencia de los metabolitos secundarios con actividad biofungicida, tales como los monoterpenoides, sesquiterpenoides

2014; Pineda *et al.*, 2012; Nagano and Batalini, 2021). It is also possible that the presence of several secondary metabolites could have a synergic effect that inhibits the germination of *H. vastatrix* (Babatunde *et al.*, 2019; Mgbeahuruike *et al.*, 2017; Durant-Archibold *et al.*, 2018, Salehi *et al.*, 2019; Mesa *et al.*, 2019). This fungicide activity might work by interacting with the cell wall or membrane of the fungus. However, further studies should be carried out to identify the possible mechanisms of action and the type of secondary metabolites with biofungicide activity.

The apolar extract was omitted in the *in vivo* tests due to its degree of environmental toxicity. Treatment with the ethanolic extracts of *P. auritum* and *A. indica* caused no increase in yellow spots or uredospore sporulation in Typica coffee plants at the three different concentrations evaluated, 1000, 3000 and 5000 ppm (Figure 3). The germination percentage remained constant at around 26.6% during the 20 days of experimentation (SENASICA 2019); that is, no new spore colonies were found on the underside of the leaves and foliar injury was minimal, according to the diagrammatic scale for evaluating the severity of coffee rust in leaves and plants, as reported by SAGARPA (2015) and SENASICA (2019). Therefore, the severity of the disease remained constant from the beginning to the end of the experiment. Only the yellowish spots caused by the uredospores of *H. vastatrix* were observed (Figure 4 C and D).

In the control treatment, the infection increased progressively until the end of the experiment, up to severity class IV or 69.3% severity (Figure 4 and 5 A). Significant differences were found between treatments when comparing their effect over time (Tukey, $P \leq 0.05$). In the coffee plants treated with copper oxychloride, the infection was observed up to 15 days after the application of the treatment. The infection increases from class two to three,

and fenilpropanoides en *P. auritum*; o bien, la presencia de los metabolitos fenólicos, alcaloides y glicósidos en *A. indica* (Mohammad *et al.*, 2014; Pineda *et al.*, 2012; Nagano y Batalini, 2021). Asimismo, se puede considerar que la presencia de varios metabolitos secundarios podría tener una sinergia para inhibir la germinación de *H. vastatrix*, es decir, una acción conjunta para incrementar su acción biofungicida (Babatunde, *et al.*, 2019; Mgbeahuruike *et al.*, 2017; Durant-Archibold *et al.*, 2018, Salehi *et al.*, 2019; Mesa *et al.*, 2019). Esta posible acción, podría estar interactuando en la pared o membrana celular del hongo, sin embargo, es importante realizar otros estudios que permitan identificar los posibles mecanismos de acción y que tipo de metabolitos secundarios están actuando como biofungicida.

En los ensayos *in vivo*, se omitió el extracto apolar debido a su grado de toxicidad para el ambiente. Mientras que al utilizar los extractos etanólicos de *P. auritum* y *A. indica* no se observó ningún incremento de manchas amarillas o esporulación de las uredosporas en las plantas de café Typica, a las tres diferentes concentraciones 1000, 3000 y 5000 ppm (Figura 3); manteniéndose un porcentaje constante de alrededor del 26.6% durante los 20 días de experimentación (SENASICA 2019); es decir, no se encontraron nuevas colonias de esporas en el envés de las hojas y se minimizó el margen de lesión foliar de acuerdo a la escala diagramática de evaluación de severidad de la roya del café en hojas y plantas, como ha sido reportado por SAGARPA (2015) y SENASICA (2019). Por lo que, la severidad se mantuvo constante desde el inicio hasta al final del ensayo, observándose solo las manchas amarillentas ocasionadas por las uredosporas de *H. vastatrix* (Figura 4 C y D).

Mientras que, en el testigo, la infección aumentó progresivamente hasta finalizar el ensayo, quedando en la clase cuatro de severidad, representada en un 69.3 % del porcentaje de severidad de la enfermedad

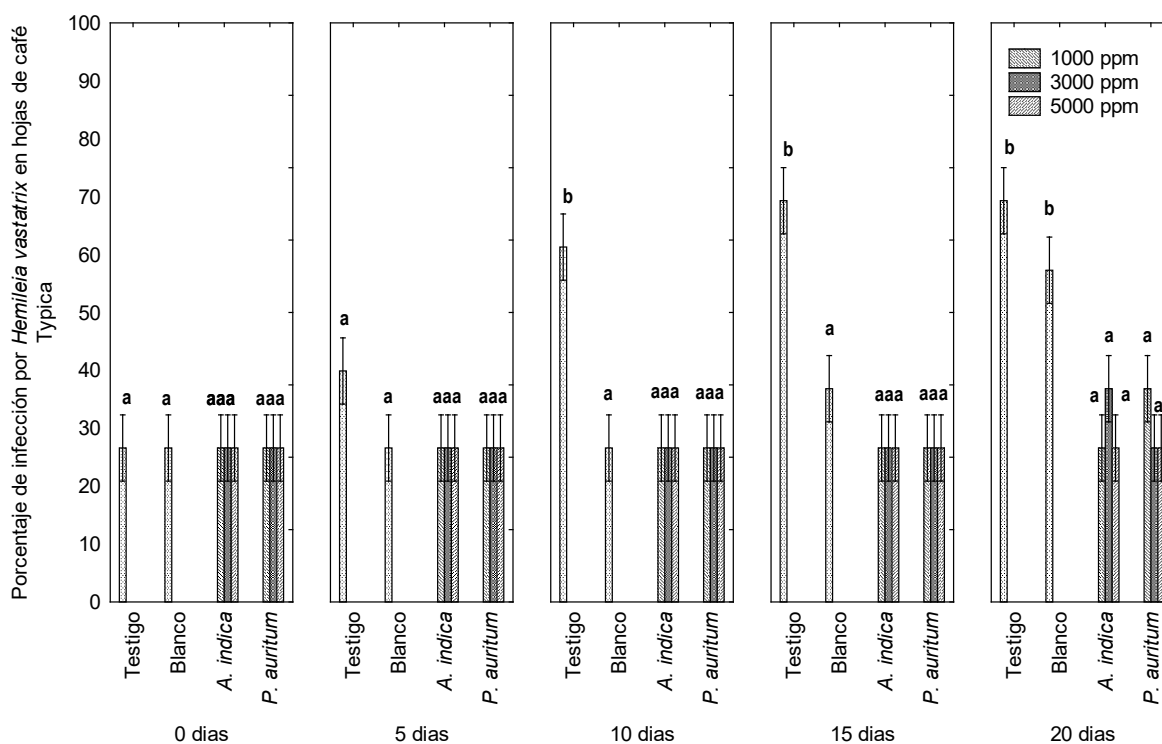


Figure 3. Severity percentage of *H. vastatrix* in Typica coffee leaves treated with foliar ethanolic extracts of *A. indica* and *P. auritum* during 20 days of treatment. On the Y-axis title: Severity of *Hemileia vastatrix* (%). Letters indicate significant differences between means (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 3. Porcentaje de severidad de *H. vastatrix* en hojas de café Typica tratadas con extractos etanólicos foliares de *A. indica* y *P. auritum* durante 20 días de tratamiento. En el título del eje Y: Severidad de *Hemilea vastatrix* (%). Las letras indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $P \leq 0.05$).

that is, from 32 to 52% severity (Figure 4), when some yellowish spots with small fungal pustules appeared on the underside of the leaf of Typica coffee plants. These signs indicate the beginning of the production of uredospores.

Therefore, the use of ethanolic extracts of *A. indica* and *P. auritum*, until now, is one of most the promising extracts as inhibiting agents of coffee rust caused by *H. vastatrix* in Typica coffee plants under greenhouse conditions. Sánchez-Fernández *et al.* (2013) indicated the importance of carrying out tests on plants under greenhouse or nursery conditions to assess the pre- and post-emergent activity of different natural compounds. Previous

(Figura 4 y 5 A). Al comparar los tratamientos a través del tiempo, se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tukey, $P \leq 0.05$). En el caso de las plantas de café tratadas con oxícloruro de cobre, la infección no se incrementó, sino que, esta se observó hasta 15 días después de la aplicación del tratamiento; la infección subió de la clase dos a la tres, representando de un 32 a 52 % de severidad (Figura 4); es decir, hubo aparición de algunas manchas amarillentas con pequeñas pústulas del hongo en el envés de la hoja de las plantas de café Typica, que indica el inicio de la producción de uredosporas. Por lo tanto, el empleo de los extractos etanólicos de *A. indica* y *P. auritum*, ha sido hasta ahora, uno

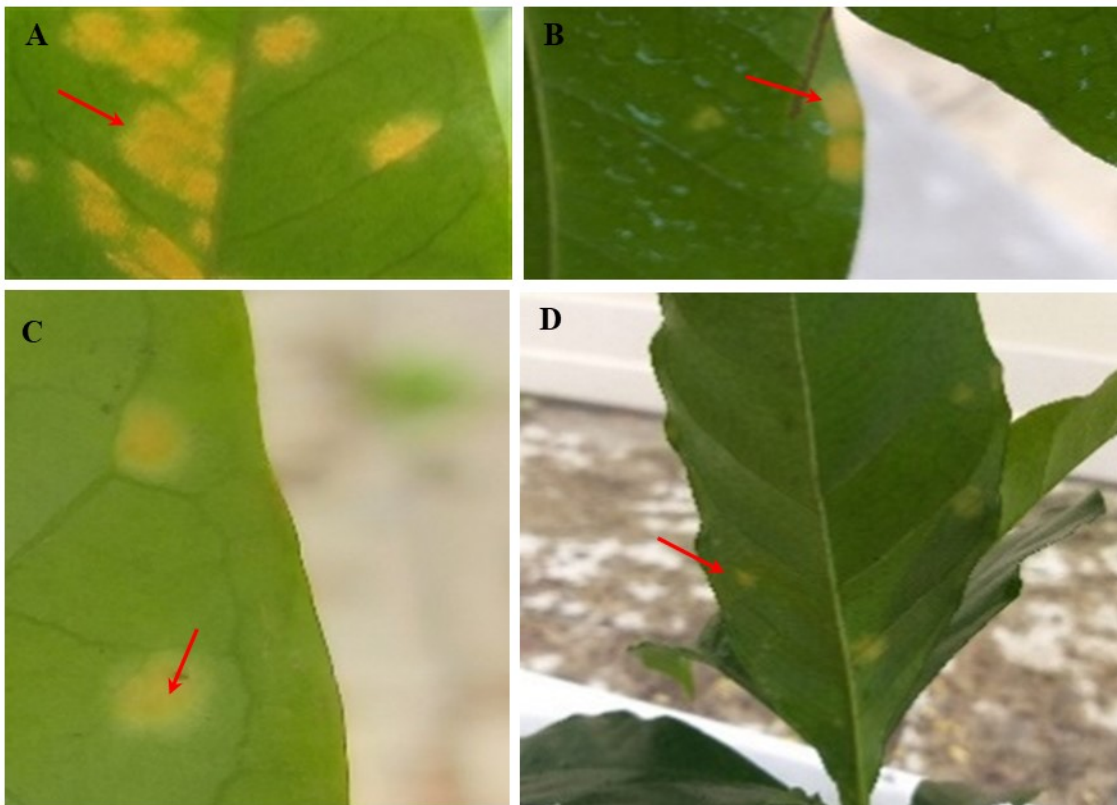


Figure 4. Effect of the application of copper oxychloride and extracts of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* on Typica coffee leaves. A) Control; red arrows indicate *H. vastatrix* infection; B) Copper oxychloride; yellowish stains; C and D) Coffee leaves treated for 15 days with extracts of *A. indica* and *P. auritum* (red arrows indicate the damage caused by the initial infection, as well as the absence of uredospores due to the application of plant extracts).

Figura 4. Efecto de la aplicación de oxiclóruo de cobre y extractos de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* en hojas de café Typica. A) Testigo, flechas rojas indican la infección de *H. vastatrix*; B) Oxiclóruo de cobre, manchas amarillentas; C y D) Hojas de café tratadas durante 15 días con extracto de *A. indica* y *P. auritum* (las flechas rojas señalan el daño ocasionado por la infección inicial, así como la ausencia de uredosporas debido a la aplicación de los extractos vegetales).

studies have reported that the extracts of *P. auritum* and *A. indica* are effective for the management of phytopathogenic fungi in mango, avocado, apple, peach, tomato, potato and rice plantations infected with fungi of the genera *Colletotrichum*, *Botryodiplodia*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Sarocladium*, *Bipolaris*, *Fusarium* (Pineda *et al.*, 2012), *Rhizoctonia*, *Sclerotium* (Mohamed-Ali *et al.*, 2017), *Sclerotinia* (Mohammad *et al.*, 2014), *Lagenidium*, and *Metarhizium* (Mohanty *et al.*,

de los extractos prometedores para ser aplicados en plantas de café Typica en condiciones de vivero, y como preventivo a una creciente infección de roya del café *H. vastatrix*. Sánchez-Fernández *et al.* (2013), reportaron la importancia de realizar pruebas en invernadero o viveros sobre especies vegetales cultivables o sobre malezas para determinar la actividad de tipo pre y post-emergente; así como la identificación de los compuestos naturales y activos potenciales.

2008). These studies support the use of extracts of *P. auritum* and *A. indica* as biofungicides in Typica coffee plants before planting and the effective concentration of the extracts ranges between 1000 and 5000 ppm. The use of these extracts within the framework of sustainable agriculture is a promising alternative due to their effectiveness, low cost and easy degradation due to their natural origin (Rodríguez *et al.*, 2000; Villavicencio-Nieto and Pérez-Escandón, 2010). A classification consensus of these extracts should be established according to their effect: active, moderately active, slightly active and innocuous. This would allow to select the plant extracts with the most promising antifungal activity (Mesa *et al.*, 2019). The results of the present study support the use of extracts from *A. indica* and *P. auritum* as biofungicides against *H. vastatrix*.

The foliar extracts of *A. indica* and *P. auritum*, in concentrations of 1000, 3000 and 5000 ppm, inhibited the germination of *H. vastatrix* during the 120 hours of treatment, causing discoloration and deformation in the external structure of *H. vastatrix* uredospores. Both extracts showed biofungicidal activity against *H. vastatrix* uredospores when applied to Typica variety coffee plants, reducing the spread of the disease during 20 days after the application of the extracts. In conclusion, extracts of *A. indica* and *P. auritum* in concentrations of 1,000 to 5,000 ppm are an effective alternative for the preventive management of coffee rust, mainly in nursery plants.

CITED LITERATURE

Alvarado-Castillo G, Benítez-Badillo G, Lozada-García JA, Ortiz-Ceballos G and Torres-Pelayo VR. 2017. Uredospores mycelium germination inhibition of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) through three alternative compounds: First study. *Wulfenia* 24: 65-78. <http://www.multidisciplinarywulfenia.org/auto/index.php/archive/part/24/2/1/?currentVol=24¤tissue=2>

Asimismo, previos estudios han reportado que los extractos de *P. auritum* y *A. indica* son efectivos para el manejo de hongos fitopatógenos de plantaciones de mango, aguacate, manzana, durazno, tomate, papa y arroz infectados con hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Botryodiplodia*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Sarocladium*, *Bipolaris*, *Fusarium* (Pineda *et al.*, 2012); *Rhizoctonia* y *Sclerotium* (Mohamed-Ali *et al.*, 2017), *Sclerotinia* (Mohammad *et al.*, 2014), *Lagenidium* y *Metarhizium* (Mohanty *et al.*, 2008). Estas investigaciones, refuerzan la idea de que los extractos de *P. auritum* y *A. indica* podrían ser utilizados como biofungicidas potenciales en plantas de café Typica previo a ser sembradas en parcelas y, la concentración a elegir podría ser entre un rango de 1000 a 5000 ppm. Así, el empleo de estos extractos en el marco de una agricultura sostenible, es una alternativa promisoriosa por su efectividad, bajo costo y de fácil degradación debido a su origen natural (Rodríguez *et al.*, 2000; Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2010). Aunado a lo anterior, se recomienda establecer un consenso de clasificación según el efecto del extracto como: activo, moderadamente activo y ligeramente activo e inocuo; que permita clasificar al extracto vegetal como antifúngico promisorio (Mesa *et al.*, 2019). Finalmente, sugerimos que el empleo de *A. indica* y *P. auritum* constituye una alternativa novedosa como biofungicida contra *H. vastatrix*.

Se concluye que los extractos foliares de *A. indica* y *P. auritum* a concentraciones de 1000, 3000 y 5000 ppm inhibieron la germinación de *H. vastatrix* durante las 120 horas de tratamiento, causando uredosporas *H. vastatrix* decoloradas y deformadas en la estructura exterior. Asimismo, ambos extractos aplicados en plantas de café variedad Typica, presentaron actividad biofungicida contra las uredosporas de *H. vastatrix* y redujeron la propagación de la enfermedad durante los 20 días de aplicación de los extractos. Por lo tanto, los extractos de *A. in-*

- Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderach P, Anzueto F, Hruska AJ and Morales C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7: 303-321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Avelino J and Rivas G. 2013. La roya anaranjada del café. 1-47pp. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>
- Babatunde DE, Otusemade GO, Efeovbokhan VE, Ojewumi ME, Bolade OP and Owoeye TF. 2019. Chemical composition of steam and solvent crude oil extracts from *Azadirachta indica* leaves. *Chemical Data Collections* 20: 100208. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2019.100208>
- Cantrell CL, Dayan FE and Duke SO. 2012. Natural products as sources for new Pesticides. *Journal of Natural Products* 75(6): 1231-1242. <https://doi.org/10.1021/np300024u>
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS and Vaz GRO. 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* 60: 1144-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x>
- Durant-Archibold AA, Santana AI and Gupta MP. 2018. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. *Journal of Ethnopharmacology* 217: 63-82. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.008>
- FAO. 2015. Manejo agroecológico de la roya del café. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura ciudad de panamá. 96 p. <https://www.fao.org/documents/card/fr/c/a55342d5-58e1-4c57-b1bd-7f65cc80e547/>
- Guillén-Sánchez D, Pérez R, Andrade-Rodríguez M, López-Martínez V, Alía-Tejagal I and Juárez-López P. 2017. Eficacia de seis fungicidas en el control de *Mycosphaerella citri* Whiteside en naranja, Var., 'Valencia' en Tlayecac, Morelos, México. *Centro Agrícola* 44(3): 71-79. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852017000300010&lng=es&tlng=es
- Gregori-Valdés BS. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39 (2): 1-15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012&lng=es&tlng=es
- Heidtmann-Bemvenuti R, Tralamazza SM, Jorge Ferreira CF, Corrêa B and Badiale-Furlong E. 2016. Effect of natural compounds on *Fusarium graminearum* complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(12): 3998-4008. <https://doi:10.1002/jsfa.7591>
- Hernández-Solabac JAM, Nava-Tablada ME, Díaz-Cárdenas S, Pérez-Portilla E and Escamilla-Prado E. 2011. Migración internacional y manejo del café en dos comunidades del Centro de Veracruz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14:807-818. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000300013
- Leahy J, Mendelsohn M, Kough J, Jones R and Berckes N. 2014. Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency. *Biopesticides: state of the art and future opportunities*. American Chemical Society. 3-18 p. <https://doi:10.1021/bk-2014-1172.ch001>
- dica* y *P. auritum* a concentraciones de 1000 a 5000 ppm, son una alternativa en el manejo preventivo de la roya del café, principalmente en plantas de vivero. Esto podría ser una alternativa en el manejo preventivo en cultivos de café *Typica* en viveros.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- López-García FJ, Escamilla-Prado E, Zamarripa-Colmenero A and Cruz-Castillo JG. 2016. Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica*) en Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39(3): 297-304. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v39n3/0187-7380-rfm-39-03-00297.pdf>
- Mesa VAM, Marín PA, Ocampo O, Calle J and Monsalve Z. 2019. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 45(1): 23-30. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86458941001>
- Mgbeahuruike EE, Yrjönen T, Vuorela H and Holm Y. 2017. Bioactive compound from medicinal plants: Focus on the *Piper* species. *South African Journal of Botany* 112: 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>
- Mohammad RO, Ling Wang, Zhou qi Cui, Chunlan Yang, Tao Zhongyun and Guan-Lin Xie. 2014. Antifungal and SAR potential of crude extracts derived from neem and ginger against storage carrot rot caused by *Sclerotinia Sclerotium*. *Industrial Crops & Products* 55:130-139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.012>
- Mohamed-Ali EO, Akhtar Shakil N, Singh Rana V, Sarkar DJ, Majumder S, Kaushik P, Bhushan Singh B and Kumar J. 2017. Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oil against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Industrial Crops & Products* 108: 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.061>
- Mohanty SSG, Raghavendra K and Prasad Dash A. 2008. Influence of growth medium on antifungal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) against *Lagenidium giganteum* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycoscience* 49: 318-320. <https://doi.org/10.1007/S10267-008-0425-5>
- Montes-Belmont R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología* 29: 73-82. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000100010&lng=es
- Nagano MS and Batalini C. 2021. Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas* 50(1): 29-47. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v50n1.95447>
- Ordanza-Beneitez MA. 2017. Biopesticidas: Tipos y aplicaciones en el control de plagas agrícolas. *Agroproductividad* 10 (3): 31-367. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/966>

- Pérez AP and Pérez TM. 2012. Las denominaciones de origen del café mexicano y sus cuestionamientos como modelo de desarrollo regional. *Revista Perspectivas Rurales Nueva Época* 10(3): 43-56. <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/perspectivasrurales/article/view/3381>
- Pineda RM, Samuel Vizcaino P, García MPP, Gil GGH and Durango DLR. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* and *Piper holtonii* Against phytopathogenic fungi. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(4): 507-515. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000400008>
- Polanco-Florián LG, Alvarado-Gómez OG, Olivares-Sáenz E, González-Garza R and Pérez-González O. 2020. Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11 (5): 1069-1081. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2272>
- Rodríguez AT, Morales D and Ramírez MA. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales* 21(2): 79-82. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215024014>
- Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, Khan T, Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Turkdonmez E, Valussi M, Tumer TB, Monzote Fidalgo L, Martorell M and Setzer WN. 2019. *Piper* species: A comprehensive review of their phytochemistry, biological activity and applications. *Molecules* 24(7): 1364. <https://doi:10.3390/molecules24071364>
- Sánchez-Fernández ER, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez A, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez MC and Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16 (2): 132-146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- SAGARPA. 2015. Estudio de necesidades de innovación productiva para los cafeticultores del estado de Tabasco. 1-122 p. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346977/Cafeticultores_Ejecutivo.pdf
- SENASICA. 2019. Roya del caféto (*Hemileia vastatrix*). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Última actualización: mayo de 2019. Ficha Técnica No. 40. 1-16 p.
- SINAVEF. 2013. Manual técnico para el manejo preventivo de la roya del caféto. México. 26 p. <http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/Manualtecnicoroya.pdf>
- Silva-Acuña R, Zambolim L and Alvarez-Venegas VH. 2002. Estrategias de control de la roya del caféto con la aplicación de fungicida protector y sistémico en viçosa, minas gerais, Brasil. *Bioagro* 14(2): 85-97. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714205>
- Shigueoka LH, Hiroshi-Sera G, Sera T, de Batista Fonseca IC, Junior VM, Andrazi E, Gimenez-Carvalho F, Gonçalves-Gardiano C and Carducci FC. 2014. Selection of Arabic coffee progenies with rust resistance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14(2): 88-93. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n2a16>
- Sparks TC, Hahn DR and Garizi NV. 2017. Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest management science* 73(4):700-715. <https://doi.org/10.1002/ps.4458>
- Várzea VM and Marques DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. In: Zambolin L, Zambolim, EM, Várzea VM. (Eds.) Durable Resistance of Coffee Leaf Rust. Editora Universidade Federal de Viçosa Brasil. 53-74 p.
- Villavicencio-Nieto MA and Pérez-Escandón BE. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el Estado de Hidalgo, México. 30: 193-238. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200012&lng=es&tlng=es
- Virginio-Filho EM and Astroga-Domian C. 2015. Prevención y control de la roya del café: manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. 1ºed., Turrialba, C.R: CATIE. No. 131. 1-96p. http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/8186/Prevencion_y_control_de_la_roya_del_cafe.pdf

Diagrammatic scale for rust severity assessment in broad bean (*Vicia faba*)

Escala diagramática para evaluar la severidad de roya en haba (*Vicia faba*)

Juyma Mayvé Fragoso-Benhumea, Jesús Ricardo Sánchez-Pale*, Álvaro Castañeda-Vildózola, Omar Franco-Mora, Ana Tarín Gutiérrez-Ibáñez, Alejandra Contreras-Rendón, Postgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 15.5, El Cerrillo, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, C.P. 50200, México; Rómulo García-Velasco, Centro Universitario Tenancingo Universidad Autónoma del Estado de México, Km. 1.5 Carretera Tenancingo Villa Guerrero, Tenancingo Estado de México C.P. 52400 México.

*Corresponding author: jrsanchezp@uaemex.mx

Received: June 02, 2022.

Accepted: August 23, 2022.

Fragoso-Benhumea JM, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildózola A, Franco-Mora O, Gutiérrez-Ibáñez AT, Contreras-Rendón A and García-Velasco R. 2022. Diagrammatic scale for rust severity assessment in broad bean (*Vicia faba*). Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 474-482.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-2>

First DOI publication: August 30, 2022.

Primera publicación DOI: 30 de Agosto, 2022.

Abstract. *Uromyces viciae-fabae* has increased in economic importance in broad bean-producing regions of central Mexico. It is therefore convenient to have a standardized system to quantify its severity. The objective of this study was to generate and validate a diagrammatic scale to evaluate the severity of rust on broad bean leaves. We collected

Resumen. *Uromyces viciae-fabae* ha incrementado su importancia económica en regiones productoras del centro de México y es conveniente que se cuente con un modelo para cuantificar su severidad. El objetivo de este trabajo fue generar y validar una escala diagramática para evaluar la severidad de la roya en hojas de haba. Se colectaron hojas de haba infectadas naturalmente en diferentes grados de daño en plantaciones comerciales del Valle de Toluca, y hojas sanas. Se tomaron 110 hojas representativas y se realizó una discriminación para seleccionar el rango de forma visual, posteriormente se digitalizaron y evaluaron para obtener el valor real de la severidad de cada hoja con el software ©ASSESS 2.0. Se generó una escala diagramática con 6 clases, y se verificó su exactitud, precisión (β_0) y reproducibilidad (β_1) mediante la evaluación de 58 hojas por 20 evaluadores. Los resultados obtenidos se analizaron mediante una

infected broad bean leaves with different degrees of damage from commercial crops in the Valle de Toluca and the southeastern region of Mexico State. One hundred and ten leaves representing the disease were taken and group discrimination was carried out to select the ranking visually. Then, the leaves were scanned and evaluated to obtain the real severity value for each leaf using the software ©ASSESS 2.0. A six-class diagrammatic scale was generated: 0 (0.0), 1 (>0.1-6.0), 2 (>6.1-12.0), 3 (>12.1-24.0), 4 (>24.1-56.0) y 5(>56.1-<100), and the exactitude, precision, and reproducibility of its estimations were verified. Fifty-eight leaves were evaluated by 20 evaluators without previous knowledge of the disease; the results obtained were analyzed using simple linear regression. In the initial selection evaluation, average r^2 values of 0.738 were obtained, without scale, while for the evaluation where the proposed scale was used, the average was 0.93, which confirms adequate levels of accuracy and reproducibility that the proposed scale can provide, for this disease.

Keywords: *Uromyces viciae-fabae*, damage evaluation, epidemiology.

The broad bean (*Vicia faba*) is the seventh most important grain legume in the world. It is consumed green in the pod and as dry grain (SIAP, 2020). In 2020, the State of Mexico was the main producer of green broad beans with 39111 t (47.4%), followed by Puebla with 28529 t (34.6%) and Michoacán with 6388 t (7.7%). These three states accounted for 29.9% of total national production (SIAP, 2020).

According to a study by López (2013) in the Valley of Toluca, in recent years, diseases caused by phytopathogenic fungi have caused increasing damage to crops. Some particularly damaging diseases are chocolate spot (*Botrytis fabae*), brown

regresión lineal simple; en la evaluación inicial de selección se obtuvieron valores promedio de r^2 de 0.738, sin escala, mientras que para la evaluación donde se usó la escala propuesta la media fue de 0.93, lo que confirma niveles adecuados de exactitud y reproducibilidad que puede brindar la escala propuesta para esta enfermedad.

Palabras clave: *Uromyces viciae-fabae*, evaluación de daño, epidemiología.

El haba (*Vicia faba*), es la séptima leguminosa de grano más importante en el mundo y se consume en vaina verde y grano seco (SIAP, 2020). En 2020 el Estado de México fue el principal productor de haba verde con 39,111 t (47.4%), seguido por Puebla con 28,529 t (34.6%) y Michoacán con 6,388 t (7.7%), por lo que estas tres entidades representaron el 29.9% de la producción nacional total (SIAP, 2020).

Según López (2013), en el Valle de Toluca, en los últimos años, las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos han incrementado sus daños, sobresaliendo la mancha de chocolate (*Botrytis fabae*), la mancha café (*Ascochyta fabae*), la pudrición de la raíz (*Rhizoctonia solani*) y la roya (*Uromyces viciae-fabae*). Esta última se puede presentar desde el estado de plántula, hasta la madurez del cultivo. Afecta cualquier parte de la planta, preferentemente a las hojas de las partes medias y basales (Gautam *et al.*, 2020), pero también se ha observado en las hojas superiores con menor incidencia (Lopez, 2013). Las pústulas son de color café marrón, ubicadas en el centro de halos cloróticos que ocurren en el haz y en el envés de las hojas (Gautam *et al.*, 2020). En otros estudios, dentro del halo se presentan varias pústulas dispuestas en círculos o irregularmente (Gautam *et al.*, 2020), afectando el rendimiento de las plantaciones desde un

spot (*Ascochyta fabae*), root rot (*Rhizoctonia solani*) and rust (*Uromyces viciae-fabae*). The latter can attack plants from the seedling stage through maturity. It affects any part of the plant, preferably the leaves in the middle and basal parts (Gautam *et al.*, 2020), but it has also been observed attacking the upper leaves, although less frequently (Lopez, 2013). The pustules are brownish-brown in color, located in the center of chlorotic halos that appear on the upper and lower sides of the leaves (Gautam *et al.*, 2020). In other studies, within the halo there are several pustules arranged in circles or irregularly (Gautam *et al.*, 2020). The reduction in the yield of the crops affected by this disease ranges from 40% (López, 2013) to 80%, but its effect goes beyond crop losses since production costs can exceed 30 thousand pesos per hectare depending on the geographical area (SIAP, 2020).

To date, no scale for quantifying the severity of rust in broad bean crops has been published. Such a scale would allow standardizing the evaluation of crop damage. Previously used scales were developed for beans and soybeans (Godoy *et al.*, 2006; Stavely, 1984). Several methods allow estimating the severity of a phytopathogenic disease as the proportion of affected tissue to the total area of the plant host, but most have precision, accuracy and reproducibility issues (Bock *et al.*, 2022). Rico *et al.* (2019) point out that logarithmic diagrammatic scales are among the most widely used tools for measuring damage. These scales consist of an illustrated representation of a series of plants, or parts of plants, showing symptoms of a disease in different degrees of severity.

This type of measurement system has the advantage of being practical, easy to use and manage (Lavilla *et al.*, 2022). Not all measurement systems based on diagrammatic scales are logarithmic, some are linear or arbitrary. These systems are important tools for evaluators working in the field,

40% (López, 2013) hasta un 80%, pero su efecto va más allá de cosecha no recuperable ya que los costos de producción sobrepasan los 30 mil pesos por hectárea dependiendo de la zona geográfica (SIAP, 2020).

Hasta el momento no se ha publicado una escala de cuantificación de la severidad de roya para el cultivo de haba que estandarice la evaluación del daño. Las escalas utilizadas con anterioridad corresponden a frijol y soja (Godoy *et al.*, 2006 y Stavely, 1984), por lo que es necesario elaborar dicha escala en haba que permita evaluar el daño de esta enfermedad y estandarizarla. Existen diversos métodos que permiten estimar la severidad de un fitopatógeno como proporción del tejido afectado con respecto al área total del hospedante, pero la mayoría adolece de problemas por los diferentes errores de precisión, exactitud y reproducibilidad (Bock *et al.*, 2022). Rico *et al.* (2019) señalaron que las escalas diagramáticas logarítmicas constituyen una de las herramientas más ampliamente utilizadas en la medición de daño. Estas escalas consisten en la representación ilustrada de una serie de plantas o partes de las plantas, mostrando síntomas de una enfermedad en diferentes grados de severidad.

Este tipo de sistema de medición tiene la ventaja de ser práctico, de fácil uso y manejo (Lavilla *et al.*, 2022). No todos los sistemas de medición con base en escalas diagramáticas son logarítmicas, algunas son lineales o totalmente arbitrarias. Estos sistemas son importantes debido a la participación de grupos de evaluadores en condiciones de campo, los cuales resultan esenciales en sistemas de vigilancia epidemiológica (Ortega-Acosta *et al.*, 2016; Lavilla *et al.*, 2022).

Para la elaboración de escalas se deben considerar aspectos como, los límites superior e inferior, los cuales deben corresponder, respectivamente, a la cantidad máxima y mínima de la enfermedad encontrada en el campo; la representación de los

which are crucial participants in epidemiological surveillance systems (Ortega-Acosta *et al.*, 2016; Lavilla *et al.*, 2022).

The construction of these scales must take into account aspects such as the upper and lower limits, which should correspond to the maximum and minimum amount of the disease found in the field, respectively. The representation of the symptoms must be as close as possible to what is observed in the plants, and the intermediate levels of disease severity should consider the limitations of human vision, as defined by Weber-Fechner laws (Nutter and Schultz, 1995). These diagrammatic scales must be tested (validated) before being proposed as a standard method of disease quantification. If they produce unsatisfactory results, they should be corrected (Bock *et al.*, 2022). The present study aimed to generate and validate a diagrammatic scale to evaluate the severity of *U. viciae-fabae* in broad bean crops.

During the spring-summer agricultural cycle of 2020-2021, broad bean leaves naturally infected by *U. viciae-fabae* were collected in one-hectare commercial plots located in the municipalities of Zinacantepec (2,123,460 UTM N, 417,460 UTM W), Toluca (2,123,580 UTM N, 426,120 UTM W), and Calimaya (2,115,960 UTM N, 427,990 UTM W). A directed sample of 20 leaves was taken from each plot, each carefully selected to have a wide diversity of damage degrees and healthy leaves. For their transfer, the leaves were covered with newspaper and placed in a botanical press to avoid damage or contamination. They were transferred to the Faculty of Agricultural Sciences of the Autonomous University of the State of Mexico. From this collection, a sample of 110 leaves with different degrees of damage was selected. This sample was subjected to a visual classification process using variable ranges. Subsequently, the leaves were digitized as images using a

síntomas, debe estar lo más cerca posible a lo observado en la planta; y los niveles intermedios de la severidad de la enfermedad, deben abarcar las limitaciones de la visión humana, tal como se definen en la “Ley del estímulo de Weber-Fechner” (Nutter y Schultz, 1995). Además, las escalas diagramáticas deben ser probadas (validadas) antes de ser propuestas como un método estándar de cuantificación de enfermedades y en el caso de producir resultados insatisfactorios, estas deben corregirse (Bock *et al.*, 2022). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue generar y validar una escala diagramática para evaluar la severidad de *U. viciae-fabae* en el cultivo de haba.

Durante el ciclo agrícola primavera-verano 2020-2021 se realizó una colecta de hojas de haba infectadas naturalmente por *U. viciae-fabae* en parcelas comerciales de una hectárea, ubicadas en los municipios de Zinacantepec (2,123,460 UTM N, 417,460 UTM O), Toluca (2,123,580 UTM N, 426,120 UTM O) y Calimaya (2,115,960 UTM N, 427,990 UTM O). En cada parcela se tomó una muestra dirigida de 20 hojas, cada una seleccionada minuciosamente para que existiera una amplia diversidad de niveles de daño y hojas sanas. Para su traslado, las hojas se cubrieron con papel periódico y se colocaron en una prensa botánica con la finalidad de evitar daño, o contaminación y fueron trasladadas a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. De esta colección se seleccionó una muestra de 110 hojas con diferentes niveles de daño, las cuales se sometieron a un proceso de clasificación visual en rangos variables; y posteriormente las hojas se ingresaron a una impresora multifuncional de la marca HP-® LASERJET PRO MFP M127fn para ser digitalizadas como imágenes (Scapin *et al.*, 2014).

Las hojas digitalizadas fueron sometidas a una primera evaluación por 20 evaluadores sin conocimientos previos, para que les asignaran un porcen-

multifunctional printer (HP® LASERJET PRO MFP M127fn) (Scapin *et al.*, 2014).

The digitized leaves were subjected to a first evaluation by 20 evaluators without prior knowledge who assigned them a disease percentage. This evaluation was made based on the percentage of actual severity (S) of the disease, based on the formula: severity = (disease area/total area of the image) * 100 (Nutter *et al.*, 2006). The minimum and maximum severity values were used to define the minimum and maximum values of the proposed scale. These results were compared with the values assigned by the ©ASSESS 2.0 software (Image Analysis Software for Plant Disease Quantification).

The scale was validated using 58 digitized leaves that represented the different degrees of severity. The images were randomized and projected as individual slides using the Power Point program (Microsoft 365®) to 10 of the 20 evaluators involved in the first evaluation, selected according to the accuracy of their evaluation and their commitment to the project. Using a simple linear regression, the accuracy and precision of the severity evaluation of each evaluator were estimated and compared with the actual severity value obtained with the ©ASSESS 2.0 software.

The accuracy of the evaluation was determined using a T test (severity estimated by each evaluator compared with actual values of severity estimated by the software) applied to the intercept of the linear regression (β_0) to verify the intercept hypothesis $H_0: \beta_0=0$, and by checking that the coefficient of the slope (β_1) was different from 1 ($H_1: \beta_1=1$), with $P \leq 0.01$. The precision of the estimates was determined based on the coefficient of determination (r^2) of the regression and the absolute error ($1-r^2$) (Hernández and Sandoval, 2015). The linear regression analysis was carried out with the statistical software SAS (Statistical Analysis System) version 9.0.

taje de enfermedad. Esta evaluación se hizo considerando el porcentaje de severidad real (S) de la enfermedad, con base en la fórmula: severidad = (área enferma / área total de la imagen) * 100 (Nutter *et al.*, 2006); donde el valor mínimo y máximo de severidad se utilizaron para definir los límites mínimos y máximos de la escala propuesta. Estos resultados fueron comparados con los valores asignados por el software ©ASSESS 2.0 (Image Analysis Software for Plant Disease Quantification).

Para validar la escala se utilizaron 58 hojas digitalizadas, representativas de los diferentes grados de severidad. Las imágenes fueron aleatorizadas y proyectadas en diapositivas individuales con el programa Microsoft 365® Power Point, a 10 de los 20 evaluadores ocupados en la primera evaluación, seleccionados según el nivel de acierto obtenido y su compromiso para el proyecto. Mediante una regresión lineal simple se estimó la exactitud y precisión de las evaluaciones de severidad de cada evaluador y se comparó con el valor real de severidad obtenidos con el software ©ASSESS 2.0.

La exactitud se determinó con la prueba T (severidad estimada por cada evaluador contra valores reales de severidad estimado por el software) aplicada al intercepto de la regresión lineal (β_0), para verificar la hipótesis del intercepto $H_0: \beta_0=0$; y con el coeficiente de la pendiente de la recta (β_1) para estimar si fue diferente de 1 ($H_1: \beta_1=1$), con $P \leq 0.01$. La precisión de las estimaciones fue determinada con el coeficiente de determinación (r^2) de la regresión y el error absoluto ($1-r^2$) (Hernández y Sandoval, 2015). El análisis de regresión lineal se llevó a cabo con el software estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0.

La escala diagramática de severidad para *U. viciae-fabae* obtenida, quedó constituida por seis clases, representadas por los intervalos de valores 0 (0,0), 1 (>0.1-6.0), 2 (>6.1-12.0), 3 (>12.1-24.0), 4 (>24.1-56.0) y 5 (>56.1-<100). El valor máximo de severidad observado fue del 56%, con presencia de

The diagrammatic severity scale for *U. viciae-fabae* obtained was made up of six classes, represented by the following ranges of values: 0 (0.0), 1 (>0.1-6.0), 2 (>6.1-12.0), 3 (>12.1-24.0), 4 (>24.1-56.0), and 5 (>56.1-<100). The maximum severity value was 56%, associated with discoloration to a pale green hue and coalesced pustules, which meets the characteristics for this degree of damage. The lower limit observed was 0% damage (Figure 1).

The values of r^2 (coefficient of determination) of the first evaluation ranged from 0.575 to 0.892, with a mean of 0.738 (Table 1). In the evaluation using the proposed scale, the values ranged from 0.90 to 0.97, with a mean of 0.93 (Table 1). Therefore, the evaluations can be considered accurate, according to Belan *et al.* (2014). Ortega-Acosta *et al.* (2016) reported average results >0.80 in 100% of the combinations of the two evaluations. This indicates that the diagrammatic scales are reproducible and

decoloraciones a una tonalidad verde pálido, y coalescencia de las pústulas, que cumple con las características para este nivel; en contraste, el límite inferior observado fue del 0% de daño (Figura 1).

En la estimación del daño de la enfermedad, los valores de r^2 (coeficiente de determinación) en la evaluación de selección de hojas para la formación de la escala, sus valores variaron de 0.575 a 0.892, con media de 0.738 (Cuadro 1); mientras que en la evaluación donde se usó la escala propuesta los valores fluctuaron de 0.90 a 0.97, con media de 0.93 (Cuadro 1) por lo que se consideran precisas de acuerdo a lo mencionado por Belan *et al.* (2014). En este mismo sentido Ortega-Acosta *et al.* (2016) reportan resultados promedio >0.80 en el 100% de las combinaciones de las dos evaluaciones, lo que es indicativo de que las escalas diagramáticas son reproducibles y es posible su implementación en campo, ya que los resultados de las evaluaciones mejoraron con el uso de la escala propuesta.

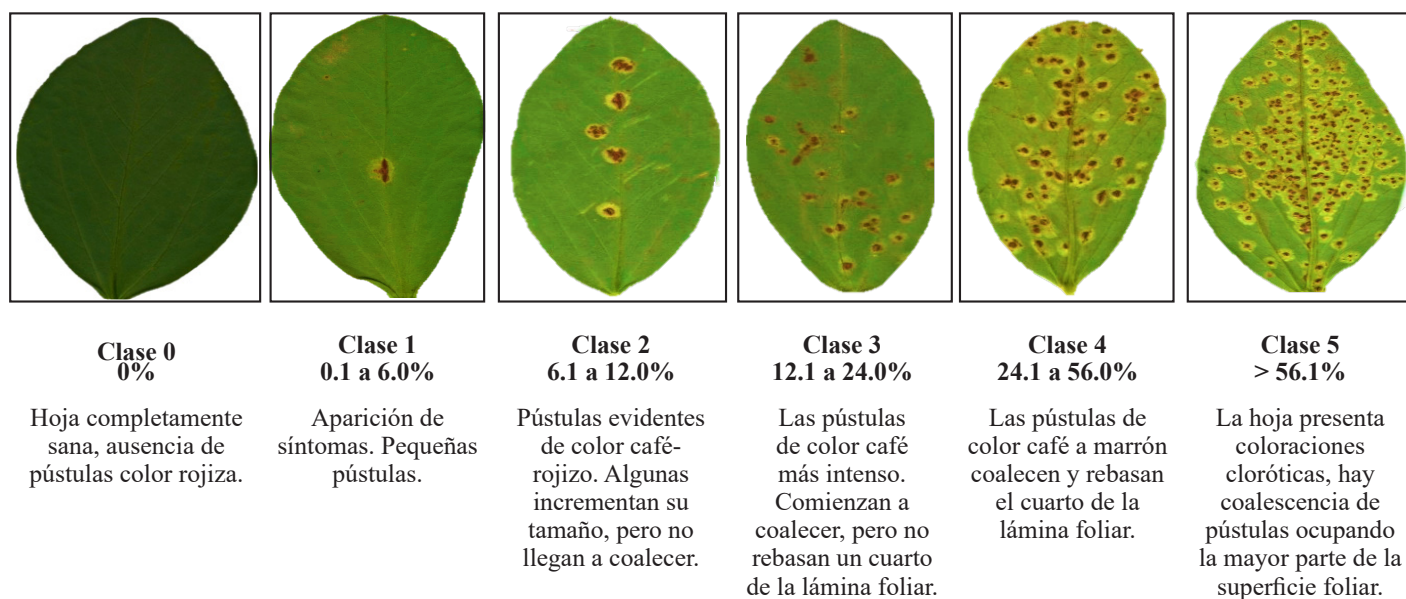


Figure 1. Diagrammatic scale to evaluate the severity of broad bean rust caused by *Uromyces viciae-fabae*.
Figura 1. Escala diagramática para evaluar la severidad de la roya del haba ocasionada por *Uromyces viciae-fabae*.

Table 1. Values of the intercept (β_0), slope of the line (β_1), coefficient of determination (r^2) and margin of error ($1-r^2$) of the linear regression of the visual estimations of the severity of rust in broad bean (*Vicia faba*), with 20 evaluators without a diagrammatic scale and 10 evaluators with the proposed severity scale.

Cuadro 1. Valores del intercepto (β_0), pendiente de la recta (β_1), coeficiente de determinación (r^2) y margen de error ($1-r^2$) de la ecuación de regresión lineal en las estimaciones visuales de la severidad de la roya en haba (*Vicia faba*) con 20 evaluadores sin escala.

| Coeficientes de Determinación | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|-------|-------|---------|------------|--------|--------|--------------|---------|----------------------------------|--------------|--------|-------|---------|
| Sin Escala | | | | | Con Escala | | | | | | | | | |
| Evaluador | b_0 | b_1 | r^2 | $1-r^2$ | Evaluador | b_0 | b_1 | r^2 | $1-r^2$ | Evaluador | b_0 | b_1 | r^2 | $1-r^2$ |
| 1 | 0.303 | 0.863 | 0.780 | 0.220 | 11 | 0.384 | 0.891 | 0.795 | 0.206 | 1 | 0.097* | 0.977* | 0.959 | 0.041 |
| 2 | 0.257 | 0.921 | 0.765 | 0.235 | 12 | 0.303 | 0.863 | 0.780 | 0.220 | 2 | 0.097* | 0.977* | 0.943 | 0.057 |
| 3 | 0.257 | 0.921 | 0.765 | 0.235 | 13 | 0.257 | 0.921 | 0.765 | 0.235 | 3 | 0.143* | 0.966* | 0.943 | 0.057 |
| 4 | 0.252 | 0.805 | 0.642 | 0.358 | 14 | 0.254* | 0.940* | 0.893 | 0.107 | 4 | 0.063* | 0.995* | 0.943 | 0.057 |
| 5 | 0.071 | 0.942 | 0.749 | 0.251 | 15 | 0.196 | 0.794 | 0.615 | 0.385 | 5 | 0.075* | 0.967* | 0.931 | 0.069 |
| 6 | 0.071 | 0.942 | 0.749 | 0.251 | 16 | 0.183 | 0.856 | 0.575 | 0.425 | 6 | 0.081* | 0.971* | 0.929 | 0.071 |
| 7 | -0.095 | 1.024 | 0.777 | 0.223 | 17 | 0.133 | 0.910 | 0.675 | 0.325 | 7 | 0.126* | 0.937* | 0.915 | 0.085 |
| 8 | -0.095 | 1.024 | 0.777 | 0.223 | 18 | 0.071 | 0.942 | 0.749 | 0.251 | 8 | 0.062* | 0.965* | 0.910 | 0.090 |
| 9 | -0.186 | 1.040 | 0.799 | 0.201 | 19 | -0.048 | 1.043 | 0.698 | 0.303 | 9 | 0.176* | 0.908* | 0.905 | 0.095 |
| 10 | -0.636 | 1.097 | 0.650 | 0.350 | 20 | -0.095 | 1.024 | 0.777 | 0.223 | 10 | 0.203* | 0.932* | 0.900 | 0.100 |
| Promedio de r^2 | | | | | | | | 0.739 | | APPS | 0.097* | 0.977* | 0.979 | 0.021 |
| | | | | | | | | | | Promedio r^2 | 0.932 | | | |

* significant: Situation where the null hypothesis ($\beta_0=0$ or $\beta_1=1$) was rejected by the t-test ($p \leq 0.05$). / *significativo: Situación en dónde la hipótesis nula ($\beta_0=0$ o $\beta_1=1$) fue rechazada por la prueba t ($p \leq 0.05$).

their implementation in the field is possible since the results of the evaluations improved with the use of the proposed scale.

The reproducibility of the evaluation of the degree of damage using the proposed scale is considered high because the evaluators estimated similar percentages of severity (Hernández and Sandoval, 2015). The determination coefficients between the different evaluators ranged from 0.90 to 0.97. Thus, it can be said that the diagrammatic scale proposed to evaluate the severity of broad bean rust fits well with the actual values of severity, which are similar to those produced by the software ©ASSESS 2.0 ($R^2=0.98$). This indicates that the evaluators were highly accurate, which reduced the absolute errors (Figure 2). This is consistent with what is reported about the regional coffee rust (*Hemileia vastatrix*) severity assessment system,

En la evaluación del nivel de daño con el uso de escala la reproducibilidad es considerada alta debido a que los evaluadores estimaron porcentajes similares de severidad (Hernández y Sandoval, 2015). Los coeficientes de determinación obtenidos entre los diferentes evaluadores variaron en el rango de 0.90 a 0.97 por lo que la escala diagramática propuesta para evaluar la roya del haba se ajusta bien a los valores reales de severidad, que son similares al compararse con el valor del software ©ASSESS 2.0 con un valor de 0.98, lo que refleja una alta precisión entre los evaluadores, en donde se muestra que, tanto de manera visual, como a través del software ©ASSESS 2.0, los evaluadores tuvieron un alto nivel de acierto, reduciendo los errores absolutos (Figura 2), lo que concuerda con lo reportado en el sistema regional de evaluación de severidad de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en

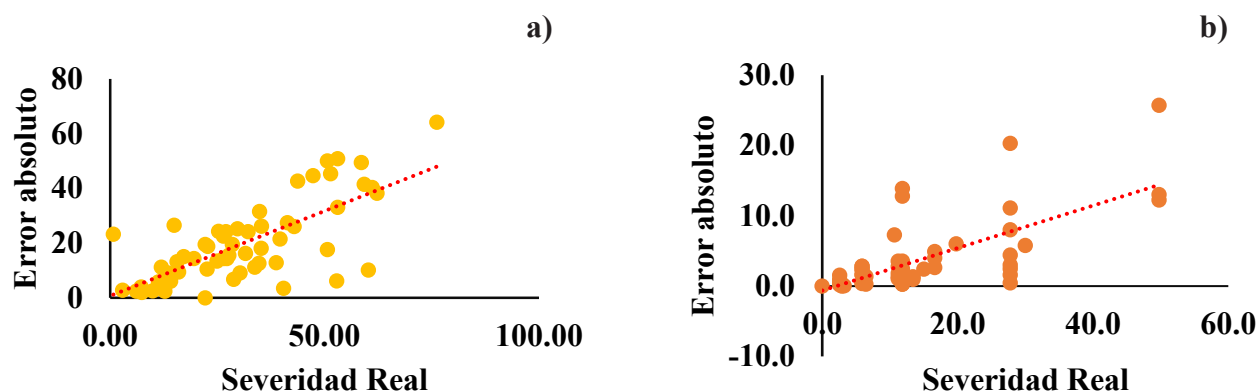


Figure 2. Actual severity vs. absolute error of the disease quantification evaluations a) without proposed diagrammatic scale and b) with proposed diagrammatic scale.

Figura 2. Severidad real vs error absoluto obtenidos en las evaluaciones de cuantificación de la enfermedad a) sin escala diagramática propuesta y b) con escala diagramática propuesta.

which concentrates accuracy and precision data under an epidemiological surveillance system (DGSV-CNRF, 2018).

Regarding the null hypothesis ($\beta_0=0$ or $\beta_1=1$), the coefficient β_1 was statistically close to 1 ($P<0.01$) (Table 1) for most of the evaluators, indicating that the visual evaluation yielded results close to the actual values, even when there was a tendency to overestimate them. Acceptable levels of precision and accuracy (β_0 and β_1) were achieved when evaluating the severity of broad bean rust using the six-class diagrammatic severity scale. The largest absolute errors were obtained when no scale was used (Figure 2). Therefore, the diagrammatic logarithmic scale generated in the present study can be considered a standardized method of quantifying the severity of rust in broad bean plants. This scale could be used as reference material, for support in the evaluation of control methods, comparison of assays in different locations, reproducible epidemiological studies, and breeding programs trying to produce resistant broad bean varieties.

la que se concentran los datos de exactitud y precisión dentro de un sistemas de vigilancia epidemiológica (DGSV-CNRF, 2018).

Con base en la hipótesis de nulidad ($\beta_0=0$ o $\beta_1=1$), el coeficiente β_1 fue estadísticamente cercano a 1 ($P<0.01$) (Cuadro 1) para la mayoría de los evaluadores, indicando que la evaluación arroja resultados cercanos a los valores reales, aun cuando existe la tendencia a sobreestimar los mismos. Con la escala de severidad diagramática de seis clases generada para evaluar la severidad de la roya del haba se proporcionan niveles aceptables de precisión y exactitud (β_0 y β_1) en las estimaciones del daño; además, los mayores errores absolutos se obtuvieron sin el uso de escalas (Figura 2), por lo que la escala logarítmica diagramática obtenida en este estudio representa un método estandarizado de cuantificación de la severidad de roya en haba, que puede ser utilizada como material de apoyo en la evaluación de métodos de control, comparación de ensayos en diferentes localidades, estudios epidemiológicos reproducibles y en programas de mejoramiento hacia una posible resistencia en variedades de haba.

ACKNOWLEDGMENTS

To the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the scholarship granted in support of this project. To the Faculty of Agricultural Sciences of the Autonomous University of the State of Mexico for providing academic support and lending its facilities to carry out this project. To the colleagues of the Specialty in Floriculture and the Master in Agricultural Sciences and Natural Resources for the support provided in the validation of this scale. To the agricultural producer Manuel Mendoza Malvárez, and to the Hernández Ramírez family for providing the plant material for this project.

CITED LITERATURE

- ASSESS 2.0. 2021. Image Analysis Software for Plant Disease Quantification. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1094/assesshelp>
- Belan L, Pozza E, Freitas M, Souza R, Jesus J and Oliveira J. 2014. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. *Journal of Phytopathology* 162:801-810. <https://doi.org/10.1111/jph.12272>
- Bock CH, Chiang KS and Del Ponte EM. 2022. Plant disease severity estimated visually: a century of research, best practices, and opportunities for improving methods and practices to maximize accuracy. *Tropical Plant Pathology* 47: 25–42. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00439-z>
- DGSV-CNRF. 2018. Manual Técnico operativo 2018, para la Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria en el cultivo del café. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Roya%20caféto/Estrategia%20operativa/ManualOperativoRoyaCafeto.pdf>.
- Gautam AK, Payal, Avasthi S and Verma RK. 2022. Biology, disease development, distribution, and control of rust pathogen *Uromyces viciae-fabae*. *Plant Pathology & Quarantine* 12(1): 60–76. <https://doi.org/10.5943/ppq/12/1/5>
- Godoy CV, Koga LJ and Canteri MG. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:063-068. <https://www.scielo.br/j/fb/a/7zsWfRPH6xXNGHjsS4ZSNwN/?format=pdf&lang=en>
- Hernández RL y Sandoval IJS. 2015. Escala Diagramática de Severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1): 95-103. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n1/2007-8080-rmfi-33-01-00095.pdf>
- Lavilla M, Ivancovich A and Díaz-Paleo A. 2022. Diagrammatic scale for assessment the severity of *Cercospora* leaf blight on soybean (*Glycine max*) leaflets. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1). <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.43338>

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para llevar a cabo este proyecto. A la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México por brindarme el apoyo académico y sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto. A los compañeros de la Especialidad en Floricultura y de la Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales por el apoyo brindado en la validación de la presente escala. Al productor Manuel Mendoza Malvárez, la familia Hernández Ramírez, por brindar el material vegetal para el presente proyecto.

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

- López RM. 2013. Tecnología de producción del Cultivo de haba para el Estado de México. ICAMEX grupo produce Estado de México. 71 p.
- Nutter FW and Schultz PM. 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17(2): 174–184. <https://doi.org/10.1080/07060669509500709>
- Nutter FWJ, Esker PD and Coelho-Netto RA. 2006. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology* 115:95-103. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Hernández-Ruiz J. 2016. Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 270-285. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-6>
- Rico JC, Quiñones EE, Rincón G, Guizar C, Morales JL, Gómez N and López L. 2019. Qualitative severity scale of *Xanthomonas vesicatoria* in chile plants cultivar Becán. *Bioteconología y Sustentabilidad* 4:47-54. <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/bioteconologiaysust/article/view/680/666>
- SAS Institute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. North Carolina, USA.
- Scapin BCR, Angelotti F, Vieira RA, Bogo A, Tessmann DJ and Perreira de Bem B. 2014. Elaboration and validation of a diagrammatic scale to assess downy mildew severity in grapevine. *Ciencia Rural*, Santa María 44: 1384-1391. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131548>.
- SIAP 2020. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap>
- Stavely JR. 1984. Pathogenic Specialization in *Uromyces Phaseoli* in the United States and Rust resistance in beans. *Plant Disease* 68(2):95-99. [https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n02\\_95.PDF](https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n02_95.PDF)