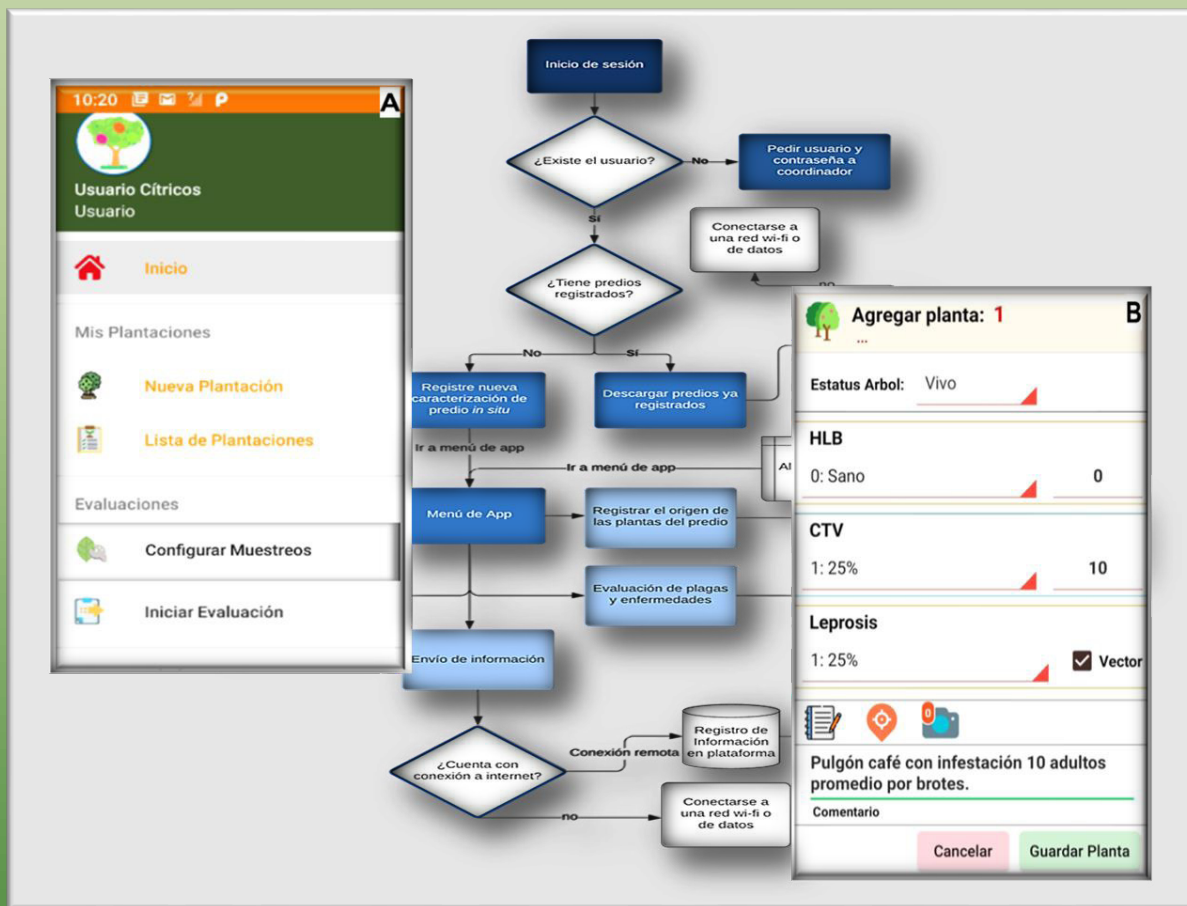


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 41, NÚMERO 1, Enero 2023



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. Irasema Vargas Arispuro, CIAD

Dr. Omar Romero Arenas, BUAP

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH

Dr. Moisés Camacho Tapia, UACH

Dr. Gilberto Manzo Sánchez, UCol

Dr. Rómulo García Velasco, UAEM

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Alejandro C. Michel Aceves, CSAEGro.

Dr. Luis Antonio Mariscal Amaro, INIFAP

Portada: Concepción estructural del desarrollo digital App ExploraCítricos v2.0 (central) para la medición de variables epidemiológicas espacio-temporal en cítricos. Ejemplos parciales de interfases de la App con vista inicial del menú de módulos (izquierda) y módulo de evaluación de plantas unitarias cítrícolas seleccionadas durante evaluación (derecha).

Original: Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Colorado OE, Coria-Contreras JJ, Guzmán-Hernández E and Robles-García P.

Página: 45-69.

LETTER TO EDITOR * CARTA AL EDITOR

- Nanotechnology in combating plant pathogens: Emerging trends, chances, and challenges** * Nanotecnología para controlar fitopatógenos: Nuevas tendencias, posibilidades y desafíos. 1
Rai MK and Avila-Quezada GD.

SCIENTIFIC ARTICLES * ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- Variability of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, resistance and agronomic behavior of two-row barley germplasm** * Variabilidad de *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, resistencia y comportamiento agronómico de germoplasma de cebada de dos hileras. 5
Rodríguez-García MF, González-González M and Mandujano-Bueno A.
- Climate, fruiting and frosty pod rot influence the epidemic intensity of *Phytophthora capsici* in cacao plantations in Mexico** * Clima, fructificación y moniliasis determinan la intensidad epidémica de *Phytophthora capsici* en cacao en México. 26
Torres-de la Cruz M, Mora-Aguilera G, Ortiz-García CF, Gaspar-Génico JA, Pérez-de la Cruz M and Acencio-Castillo N.
- App-ExploraCítricos, a digital development for integrate pest surveillance in citrus crops** * App-ExploraCítricos, un desarrollo digital para la vigilancia integral de plagas cítricas. 45
Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Colorado OE, Coria-Contreras JJ, Guzmán-Hernández E and Robles-García P.

PHYTOPATHOLOGICAL NOTES * NOTAS FITOPATOLÓGICAS

- Trichoderma asperellum* Ta13-17 in the growth of *Solanum lycopersicum* and biocontrol of *Corynespora cassiicola*** * *Trichoderma asperellum* Ta13-17 en el crecimiento de *Solanum lycopersicum* y biocontrol de *Corynespora cassiicola*. 70
Celis-Perera SE, Cristóbal-Alejo J, Reyes-Ramírez A, Garruña-Hernández R, Tun-Suarez JM and Gamboa-Angulo M.

- Mixture of clove (*Syzygium aromaticum*) and garlic (*Allium sativum*) alcoholic extracts in the control of black Sigatoka in 'Macho' plantain** * Mezcla de extracto alcohólico de clavo (*Syzygium aromaticum*) y ajo (*Allium sativum*) en el control de la Sigatoka negra en plátano 'Macho'. 82
Adriano-Anaya MdeL, Matías-Castillo S, Moreno-Castillo B, Vázquez-Ovando A and Salvador-Figueroa M.
- In vitro* evaluation of biological fungicides against *Curvularia eragrostidis*, a phytopathogenic fungus of pineapple crop** * Evaluación *in vitro* de fungicidas biológicos contra *Curvularia eragrostidis*, hongo fitopatógeno del cultivo de piña. 98
Hernández-Navarro E, Agustín-Maravilla GA, Sánchez-Rangel JC, Valadez-Ramírez P and Chan-Cupul W.
- Associated pathogens to the regressive death of Canary palm (*Phoenix canariensis*) at urban areas of Queretaro, Mexico** * Patógenos asociados a la muerte regresiva de la palma canariense (*Phoenix canariensis*) en áreas urbanas de Querétaro, México. 112
Vergara-Pineda S, Landeros-Jaime F, Malda-Barrera G, Huerta-Cantera H, Esquivel-Naranjo U, Caltzonzin-Fernández K and Pacheco-Aguilar JR.
- In vitro* inhibition of bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2** * Inhibición *in vitro* de bacterias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2. 126
Florencio-Anastasio JG, Alarcón A, García-Ávila CJ, Ferrera-Cerrato R, Quezada-Salinas A, Almaraz-Suárez JJ, Espinosa-Mendoza M, Bocanegra-Flores DA and Hernández-Ramos L.

Nanotechnology in combating plant pathogens: Emerging trends, chances, and challenges

Nanotecnología para controlar fitopatógenos: Nuevas tendencias, posibilidades y desafíos

Mahendra K. Rai*, Visiting Scientist, Department of Microbiology, Nicolaus Copernicus University, Torun, CP. 87100, Poland; **Graciela Dolores Avila-Quezada**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Escorza 900, Chihuahua, Chihuahua, CP. 31000, México.

*Corresponding author: mahendra.raiv@v.umk.pl

Received: December 26, 2022.

Accepted: December 28, 2022.

Rai MK and Avila-Quezada GD. 2023. Nanotechnology in combating plant pathogens: Emerging trends, chances, and challenges. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 1-4.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2212-6>

First DOI publication: December 30, 2022.

Primera publicación DOI: 30 de Diciembre, 2022.

The journey from the green revolution to the gene revolution has generated many environmental problems including climate change which is one of the biggest threats to human survival. At the dawn of the 21st century, nanotechnology has emerged as a powerful tool and has been playing a pivotal role in every sphere of life such as biomedical, food and agriculture, electronics, energy, textiles, and cosmetics, among others.

The global population is increasing at a fast rate and according to a United Nations report, by 2050

La transición de la revolución verde a la revolución génica ha generado muchos problemas ambientales, incluido el cambio climático, una de las mayores amenazas para la humanidad. En los albores del siglo XXI, la nanotecnología se ha convertido en una herramienta poderosa y ha tenido un desempeño fundamental en todos los ámbitos de la vida, como la biomédica, alimentación y agricultura, electrónica, energía, textiles y cosméticos, entre otras.

La población mundial está aumentando a un ritmo acelerado y, según un informe de las Naciones Unidas, para 2050 la población mundial aumentará a 9800 millones (Lowry *et al.*, 2019). Para una población tan grande, se necesita un suministro de alimentos adicional mientras que el suelo agrícola disponible tiene limitaciones para generar el rendimiento requerido de los cultivos. Más aún, la demanda cada vez mayor de agroquímicos ha generado el aumento del costo productivo, por un lado, mientras que por otro lado, los patógenos

the population of the world will surge to 9.8 billion (Lowry *et al.*, 2019). For such a vast population we need additional food supply while the existing land has limitations of crop yield. Moreover and moreover, the ever-increasing demand for agricultural chemicals has increased the cost on one hand while on the other hand the pathogens and pests have developed resistance to the available fungicides and pesticides.

The biggest challenge before scientists, policymakers, government, and the public at large is how to increase the yield to feed the population by 2050. The researchers are trying to find out the proper solutions to develop nature-based solutions for sustainable agriculture which should be environmental-friendly and be able to feed the hunger of the exploded population globally. It is evident that we need to reduce the high chemical input in agriculture by using nature-based solutions such as plant extracts/ secondary metabolites or integrating them with the low amount of traditionally used chemicals, but another limitation is that natural compounds are not stable and rapidly affected by the change of environmental conditions. In such a situation nanotechnology has come to rescue the environment and crops by using the minimum amount with maximum yield without any chance of resistance development.

Nanotechnology deals with application of nanomaterials in the size range of 1-100 nm which can be synthesized by various physical, chemical, and biological methods. The latter is natural, cost-effective, eco-friendly, simple, more bioactive, biocompatible, and an excellent option for green and sustainable synthesis. The nanomaterials thus generated are less toxic to the aquatic flora and fauna, environment, and humans. However, our knowledge about toxicity is insufficient to draw a convincing conclusion, and therefore, extensive experimentation and analysis are essentially required to unzip the evidence-based clues for

and plagas han desarrollado resistencia a los fungicidas y plaguicidas disponibles.

El mayor desafío al que se enfrentan los científicos, productores, políticos, gobierno y la sociedad en su conjunto es cómo aumentar el rendimiento para alimentar a la población para el año 2050. Los investigadores están tratando de encontrar soluciones adecuadas para desarrollar estrategias basadas en soluciones naturales para una agricultura sostenible que debe ser amigable con el ambiente y mitigar el hambre de la población mundial. Es evidente que necesitamos reducir la alta cantidad de productos químicos en la agricultura mediante el uso de soluciones naturales, como extractos de plantas/metabolitos secundarios o integrándolos con un bajo uso de productos químicos utilizados tradicionalmente. Aunque otra limitación es que los compuestos naturales no son estables y son rápidamente afectados por los cambios ambientales. En tal situación, la nanotecnología ha emergido para rescatar al ambiente y los cultivos, utilizando mínimas cantidades con máximos rendimientos sin ninguna posibilidad de desarrollo de resistencia.

La nanotecnología se ocupa de la aplicación de nanomateriales en el rango de tamaño de 1-100 nm que pueden sintetizarse mediante diversos métodos físicos, químicos y biológicos. Este último es natural, rentable, ecológico, simple, más bioactivo, biocompatible y una excelente opción para la síntesis ecológica y sostenible. Los nanomateriales generados así son menos tóxicos para la flora y fauna acuática, el ambiente y los humanos. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre la toxicidad es insuficiente para llegar a una conclusión convincente y, por lo tanto, se requiere esencialmente una experimentación y un análisis extenso para descifrar las claves basadas en evidencia para determinar la toxicidad y así tener una mejor comprensión de los nanomateriales.

Estos nanomateriales pueden ser inorgánicos (metales y óxidos metálicos), orgánicos (materiales

the determination of toxicity to have a better understanding of nanomaterials.

These nanomaterials may be inorganic (metal and metal oxides), organic (biodegradable materials dendrimers, liposomes, cyclodextrins, micelle, etc.) or carbon-based (graphene, fullerene, single and multi-walled carbon nanotubes). In this context, more research has been focused on nanomaterials of inorganic origin. These include nanoparticles of metals their oxides and metalloids. Although these materials are bioactive, they are not biodegradable, and therefore, nanoparticles of biodegradable materials such as chitosan and sulfur can be applied so that there is no chance of toxicity.

Usually, plant diseases can be tackled by three major steps: diagnosis of the pathogens, delivery of fungicides/bactericides for slow delivery, and effective control of plant pathogens without migrating to the environment in the general and aquatic environment in particular as well as humans. Further nanomaterials can be applied to treat plant pathogens for the sustainable management of plant diseases.

The early detection of plant diseases is a crucial step in the management of plant pathogens. In light of this, nanosensors can play important role in the detection of plant diseases caused by fungi, bacteria, viruses, phytoplasma, etc. (Elmer and White, 2018). Generally, gold nanoparticle-based nanosensors, immunosensors, and DNA-based sensors are effective for the rapid detection of plant disease. After the detection of the diseases nanomaterials such as nanoparticles, liposome, niosomes, hydrogels or their hybrids can be used for the slow delivery of microbicides against pathogens. For the agri-chemical delivery, encapsulation of nanoparticles with fungicides is fundamentally required to avoid sudden delivery of these microbicides in order to protect against the harmful effect on the environment and humans.

biodegradables, dendrímeros, liposomas, ciclodextrinas, micelas, etc.) o basados en carbono (grafeno, fullereno, nanotubos de carbono de pared simple y múltiple). En este contexto, las investigaciones se han centrado en los nanomateriales de origen inorgánico. Estos incluyen nanopartículas de metales, sus óxidos y metaloides. Aunque estos materiales son bioactivos, no son biodegradables, por lo que se pueden aplicar nanopartículas de materiales biodegradables como el quitosano y el azufre para evitar la posibilidad de toxicidad.

En general, las enfermedades de plantas se pueden abordar en tres pasos principales: diagnóstico de los patógenos, aplicación de fungicidas/bactericidas como fase reactiva, y control eficaz de los fitopatógenos, sin dañar al ambiente en general y al medio acuático en particular, así como evitar daños a la salud humana. Otros nanomateriales se pueden aplicar para tratar a los fitopatógenos para el manejo sostenible de las enfermedades de plantas.

La detección temprana de enfermedades es un paso crucial en el manejo de fitopatógenos. A la luz de esto, los nanosensores pueden desempeñar un rol importante en la detección de enfermedades de las plantas causadas por hongos, bacterias, virus, fitoplasmas, etc. (Elmer y White 2018). En general, los nanosensores basados en nanopartículas de oro, los inmunosensores y los sensores basados en ADN son efectivos para la detección rápida de patógenos. Después de la detección de enfermedades, se pueden utilizar nanomateriales como nanopartículas, liposomas, niosomas, hidrogeles o sus híbridos para la liberación lenta de microbicides contra patógenos. En el caso de agroquímicos, es posible la encapsulación de nanopartículas con fungicidas para evitar la acción inmediata de estos microbicides con el fin de proteger el ambiente y la salud humana.

Existen amplias oportunidades para el uso sostenible de nanomateriales en la agricultura para lograr la producción abundante de cultivos, evitando

There are ample opportunities for the sustainable use of nanomaterials in agriculture for bumper production of crops avoiding toxicity. Some of the nanomaterials can be used for dual purposes: for the management of plant pathogens (Avila-Quezada *et al.*, 2022a), and also as essential elements for crops (Avila-Quezada *et al.*, 2022b). Nanotechnology-based crop protection also promotes crop yields and the sanctity of the environment can also be maintained. Eventually, it is sure that 21st century will be governed by a nanobiotechnology-based revolution for sustainable and climate-friendly agriculture without jeopardizing the existence of living beings. However, before its application and commercialization many ethical issues, benefits, and risks should be addressed.

la toxicidad. Algunos de los nanomateriales se pueden utilizar con un doble propósito: para el manejo de patógenos de plantas (Avila-Quezada *et al.*, 2022a), y también como nutrientes esenciales para los cultivos (Avila-Quezada *et al.*, 2022b). La protección de cultivos basada en nanotecnología promueve el rendimiento y también se puede mantener la sanidad del medio ambiente. Eventualmente, es seguro que el siglo XXI estará regido por una revolución basada en la nanobiotecnología para una agricultura sostenible y amigable con el clima, sin poner en peligro la existencia de los seres vivos. Sin embargo, antes de su aplicación y comercialización se deben abordar muchos aspectos éticos, beneficios y riesgos.

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

## CITED LITERATURE

- Avila-Quezada GD, Golinska P and Rai M. 2022a. Engineered nanomaterials in plant diseases: can we combat phytopathogens? *Applied Microbiology and Biotechnology* 106(1): 117-129. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11725-w>
- Avila-Quezada GD, Ingle AP, Golińska P and Rai M. 2022b. Strategic applications of nano-fertilizers for sustainable agriculture: Benefits and bottlenecks. *Nanotechnology Reviews* 11(1): 2123-2140. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0126>
- Elmer W and White JC. 2018. The Future of Nanotechnology in Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology* 56: 111-133. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050108>
- Lowry GV, Avellan A and Gilbertson LM. 2019. Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. *Nature Nanotechnology* 14(6): 517-522. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0461-7>



# Variability of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, resistance and agronomic behavior of two-row barley germplasm

## Variabilidad de *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, resistencia y comportamiento agronómico de germoplasma de cebada de dos hileras

**María Florencia Rodríguez-García, Miguel González-González\***. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco Km 13.5 Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, CP 56250, México. **Andrés Mandujano-Bueno**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Carretera Celaya-San Miguel de Allende Km 6.5, Celaya, Guanajuato, CP 38110, México.

\*Corresponding author: gonzalez.miguel@inifap.gob.mx.

Received: August 03, 2022.

Accepted: December 14, 2022.

Rodríguez-García MF, González-González M and Mandujano-Bueno A. 2023. Variability of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, resistance and agronomic behavior of two-row barley germplasm. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 5-25.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2208-1>

First DOI publication: December 25, 2022.

Primera publicación DOI: 25 de December, 2022.

**Abstract.** Barley crop production in Mexico in recent years has been affected by rust, of which yellow rust (YR) has regained its importance. This investigation aimed to identify the variability of YR and to evaluate the resistance level of seedlings and adult plants, the agronomic behavior of 15 advanced lines, and one control variety of two-row barley. During the 2021 spring-summer season, YR samples were collected from locations in the Highland Valleys of Central Mexico. Establishment

**Resumen.** La producción del cultivo de cebada en México en los últimos años ha sido afectada por las royas, de las cuales, la roya amarilla (RA) ha recobrado importancia. El objetivo de la investigación fue identificar la variabilidad de la RA y evaluar el nivel de resistencia en plántula y planta adulta, además del comportamiento agronómico de 15 líneas avanzadas y una variedad testigo de cebada de dos hileras. Durante el ciclo primavera-verano 2021 se colectaron muestras de RA de localidades de los Valles Altos del Centro de México y se estableció, en tres localidades un ensayo en campo para evaluar el comportamiento agronómico y resistencia en planta adulta; en invernadero se evaluó la resistencia en plántula. Se identificaron nueve aislamientos de RA, de los cuales el más frecuente fue CMEX/21.9 (27%). 12 líneas expresaron resistencia en plántula y planta adulta. Alexia “s” es la línea candidata con inmunidad a roya amarilla. Los resultados de la resistencia (campo e invernadero) y comportamiento agronómico permitió identificar

of a field test in three locations allowed estimation of the agronomic behavior and resistance in adult plants; while evaluation of seedlings resistance was in a greenhouse. Nine YR isolations were identified, of which the most frequent (27%) was CMEX/21.9. Twelve lines expressed resistance in seedlings and adult plants. Alexia “s” is the candidate line with immunity to yellow rust. The results of resistance (field and greenhouse) and agronomic behavior allowed germplasm identification with outstanding characteristics. The release of varieties with genetic resistance to diseases contributes to the reduction of environmental deterioration.

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

Barley (*Hordeum vulgare*) is a cereal whose production is used for animal and human consumption. In Mexico it is cultivated mainly as raw material for the brewing industry using awned varieties with six and two-grain rows on the ear. The SIAP (2022) reported in 2021 that the planted area in the country was 345.4 thousand hectares, of which 21% were under irrigation conditions during the autumn-winter cycle and 79% under rainfed conditions in the spring-summer cycle.

In Mexico, barley production has been an alternative for producers in the Highland Valleys of Central Mexico. According to González *et al.* (2021), in recent years the malting-brewing industry demand has increased in requirement of two-row varieties, with yield potential, quality and disease tolerance.

Among the main diseases of economic importance worldwide are those of fungal origin, where those caused by the genus *Puccinia* stand out (Dean *et al.*, 2012). Hamwieh *et al.* (2018) indicate that the most important limiting factors in barley-producing areas are yellow rust caused by *Puccinia*

germplasma con características sobresalientes. La liberación de variedades con resistencia genética a enfermedades contribuye en la disminución del deterioro del medio ambiente.

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

La cebada (*Hordeum vulgare*) es un cereal cuya producción es aprovechada para consumo animal y humano. En México se cultiva principalmente como materia prima para la industria cervecera utilizándose variedades aristadas de seis y dos hileras de grano en la espiga. El SIAP (2022) reportó que en 2021 la superficie sembrada en el país fue de 345.4 mil hectáreas de las cuales el 21% fue establecida bajo condiciones de riego durante el ciclo otoño-invierno y el 79% bajo condiciones de temporal en el ciclo primavera-verano.

En México, la producción de cebada ha sido una alternativa para los productores de la región de los Valles Altos de la Mesa Central de México. De acuerdo con González *et al.* (2021), en los últimos años se ha incrementado la demanda de la industria maltera-cervecera en el requerimiento de variedades de dos hileras, con potencial de rendimiento, calidad y tolerancia a enfermedades.

Dentro de las principales enfermedades de importancia económica a nivel mundial se encuentran las de origen fungoso, donde destacan las causadas por el género *Puccinia* (Dean *et al.*, 2012). Hamwieh *et al.* (2018) indican que los factores limitantes más importantes de áreas productoras de cebada son la roya amarilla causada por *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, la roya de la hoja (*P. hordei*) y la roya del tallo (*P. graminis*). La roya amarilla de la cebada es una enfermedad de importancia económica en zonas productoras de todo el mundo. Se han reportado grandes epidemias a nivel mundial. González *et al.* (2021) mencionan que en 1988

*striiformis* f. sp. *hordei*, leaf rust (*P. hordei*) and stem rust (*P. graminis*). Yellow rust of barley is a disease of economic importance in producing areas throughout the world. Large epidemics have been reported worldwide. Gonzalez *et al.* (2021) mention that in 1988 yellow rust caused losses of up to 50% of the yield of all the improved Mexican barley varieties sown in rainfed conditions in the Highland Valleys of Central Mexico. Smaller losses were determined in the El Bajío crops under irrigated conditions. Rodriguez *et al.* (2021) report losses in grain yield up to 53% due to yellow rust effect. In the last production cycles in Mexico, yellow rust has regained importance (Rodríguez *et al.*, 2021), partly due to climate change, the lack of resistance in the currently planted varieties and pathogen virulence change. Rodriguez *et al.* (2010) indicated that rusts in cereals could overcome the specific resistance of resistant varieties by evolving towards new pathogen biotypes or physiological races with new virulence genes, in addition, the pathogens reproduce rapidly and can move long distances.

Physiological races of economically important yellow rust have been identified in barley, such was the case of race 24 identified in Colombia in 1975 as mentioned by Dubin and Stubbs (1986) and which later spread over South America. In Mexico it appeared in 1988 and later this same race was reported in Texas in 1991 as indicated by Roelfs *et al.* (1992). Marshall and Sutton (1995) report for the United States the dominance of race 24 and the existence of race 23, later Chen (2007) reports the presence of 22 new physiological races identified since 2000 in the United States. Prashar *et al.* (2014) report for India five pathotypes of *P. striiformis* f. sp. *hordei* identified during the years 2004-2005 to 2010-2011. In Iran, Safavi *et al.* (2017) identified the presence of 10 new physiological races during 2012-2013 and indicated that it was the first report

la roya amarilla causó pérdidas de hasta 50% del rendimiento de todas las variedades de cebada mejoradas mexicanas que se sembraban en temporal en los Valles Altos Centrales del país. Pérdidas de menor cuantía se determinaron en las siembras de El Bajío en condiciones de riego. Rodríguez *et al.* (2021) reportan pérdidas en rendimiento de grano hasta de un 53% por efecto de la roya amarilla. En los últimos ciclos de producción en México, la roya amarilla ha recobrado su importancia (Rodríguez *et al.*, 2021), esto debido en parte al cambio climático, a la falta de resistencia en las variedades sembradas actualmente y al cambio de virulencia del patógeno. Rodríguez *et al.* (2010) indicaron que las royas en cereales pueden vencer la resistencia específica de variedades resistentes por la evolución hacia nuevos biotipos del patógeno o razas fisiológicas con nuevos genes de virulencia, aunado a esto los patógenos se reproducen rápidamente y pueden moverse a grandes distancias.

En cebada se han identificado razas fisiológicas de roya amarilla de importancia económica, tal fue el caso de la raza 24 identificada en Colombia en 1975 como lo mencionan Dubin y Stubbs (1986) y que posteriormente se extendió a gran parte de Sudamérica. En México se presentó en 1988 y posteriormente esta misma raza se reportó en Texas en 1991 como lo indican Roelfs *et al.* (1992). Marshall y Sutton (1995) reportan para Estados Unidos la dominancia de la raza 24 y la existencia de la raza 23, posteriormente Chen (2007) reporta la presencia de 22 nuevas razas fisiológicas identificadas desde el 2000 en Estados Unidos. Prashar *et al.* (2014) reportan para la India cinco patotipos de *P. striiformis* f. sp. *hordei* identificados durante los años 2004-2005 al 2010-2011. En Irán, Safavi *et al.* (2017) identificaron la presencia de 10 nuevas razas fisiológicas durante 2012-2013 e indicaron que fue el primer reporte de razas fisiológicas de *P. striiformis* f. sp. *hordei* en ese país.

of physiological races of *P. striiformis* f. sp. *hordei* in that country.

Rodríguez *et al.* (2019), Brown *et al.* (2001) and Gangwar *et al.* (2018) indicate that the best strategy to battle rusts in cereals worldwide is genetic control, based on the use of varieties with resistance to the various physiological races of rusts that exist in the producing regions. Sandoval *et al.* (1999; 2007), Niks (2014), and Gangwar *et al.* (2018) mention that two types of resistance have been identified in barley pathosystem; seedling resistance, which is correlated in the adult plant, and partial resistance, which is characterized by presenting susceptible seedlings, but low percentages of damaged leaf area in the adult plant. Chen and Line (2002) report 27 resistance genes for barley yellow rust.

Currently in Mexico the sowing of barley with two grain rows in the ear has increased, largely displacing the sowing of six-row genotypes, for which the objective of the present work was to identify the pathogenic variability of *P. striiformis* f. sp. *hordei* and identify genotypes of two rows with resistance to yellow rust and good agronomic behavior.

## MATERIALS AND METHODS

**Isolate identification.** 45 samples of leaves with yellow rust urediniospores were collected during the spring-summer/2021 cycle from the towns of Terrenate, Nanacamilpa and Tlaxco, Tlaxcala; Apan, Hidalgo; Chapingo and Santa Lucia, Texcoco and Toluca, State of Mexico, included within the rainfed barley producing areas of the Highland Valleys of Central Mexico. The samples were transferred, for their evaluation and conservation, to National Laboratory for Rust and other Cereal Diseases (Laboratorio Nacional de Royas y Otras Enfermedades de

Rodríguez *et al.* (2019), Brown *et al.* (2001) y Gangwar *et al.* (2018) indican que la estrategia que mejor combate las royas en cereales en todo el mundo es el control genético, basado en la utilización de variedades con resistencia a las diversas razas fisiológicas de royas que existen en las regiones productoras. Sandoval *et al.* (1999; 2007), Niks (2014) y Gangwar *et al.* (2018) mencionan que en el patosistema cebada se han identificado dos tipos de resistencia; la resistencia en plántula, la cual esta correlacionada en planta adulta y la resistencia parcial, la cual se caracteriza por presentar plántulas susceptibles, pero porcentajes bajos de área foliar dañada en planta adulta. Chen y Line (2002) reportan 27 genes de resistencia para roya amarilla de la cebada.

En México, actualmente la siembra de cebada de dos hileras de grano en la espiga se ha incrementado desplazando en gran medida la siembra de genotipos de seis hileras, por lo cual el objetivo de la presente investigación fue identificar la variabilidad patogénica de *P. striiformis* f. sp. *hordei* e identificar genotipos de dos hileras con resistencia a roya amarilla y buen comportamiento agronómico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Identificación de aislamientos.** Se recolectaron 45 muestras de hojas con urediniosporas de roya amarilla durante el ciclo P-V/2021 de las localidades de Terrenate, Nanacamilpa y Tlaxco, Tlaxcala; Apan, Hidalgo; Chapingo y Santa Lucia, Texcoco y Toluca, Estado de México, incluidas dentro de las zonas productoras de cebada de temporal de los Valles Altos del Centro de México. Las muestras se trasladaron, para su evaluación y conservación, al Laboratorio Nacional de Royas y Otras Enfermedades de Cereales (LANAREC) ubicado en El Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX),

Cereales- LANAREC) located in Valley Mexico Experimental Field (Campo Experimental Valle de Mexico-CEVAMEX), belonging to National Forestry, Agriculture and Husbandry Institute (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias - INIFAP). The samples with yellow rust urediniospores were increased for the Apizaco variety because it was considered from susceptible to moderately susceptible to yellow rust. To do this, in polystyrene cups containing a mixture of sterile soil and Peat Moss, 60:40, 12 seeds per cup were sown. Five days after sowing, all the seedlings were treated with maleic acid (MH30®) to regulate their growth. Each sample was inoculated in a glass with eight-day-old Apizaco seedlings, suspending the urediniospores in mineral oil (Sotrol® 170; Chevron Phillips Chemical Company, The Woodlands, Texas, United States), and spraying on the leaf blades with an atomizer connected to an electric compressor. The inoculated seedlings were allowed to dry for a period of 20 min, then they were transferred to a bioclimatic chamber with temperatures of 4 °C and 100% dew for 24 hours. After that period, the inoculated seedlings were transferred to a greenhouse whose temperature fluctuated between 18-20 °C. Each glass containing the seedlings was placed in individual plastic cages. Fifteen days after inoculation, isolated urediniospores were collected from each isolate, using special collectors connected to an electric compressor and storing in gelatin capsules. To obtain sufficient and pure inoculum, the collected urediniospores were increased again for the Apizaco variety, following the procedure described above.

For isolates identification, a group of 16 barley genotypes listed in Table 1 were used, which were planted, per group, in 20 × 30 × 6 cm plastic trays containing a mixture of sterile soil and Peat moss, 60:40. During planting, small holes were marked

perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Las muestras con urediniosporas de roya amarilla fueron incrementadas en la variedad Apizaco por considerarse susceptible a moderadamente susceptible a roya amarilla. Para ello, en vasos de unicel conteniendo una mezcla de tierra estéril y Peat Moss en una proporción 60:40, fueron sembradas 12 semillas por vaso. Cinco días después de la siembra todas las plántulas fueron tratadas con ácido maléico (MH30®) para regular su crecimiento. Cada muestra fue inoculada en un vaso con plántulas de Apizaco de ocho días de edad, suspendiendo las urediniosporas en aceite mineral (Sotrol® 170; Chevron Phillips Chemical Company, The Woodlands, Texas, Estados Unidos), y asperjando sobre la lámina de las hojas, con un atomizador conectado a un compresor eléctrico. Las plántulas inoculadas se dejaron secar por un período de 20 min posteriormente se pasaron a una cámara bioclimática con temperaturas de 4 °C y rocío al 100% durante 24 horas. Después de ese período las plántulas inoculadas se trasladaron a un invernadero cuya temperatura fluctuó entre 18-20 °C. Cada vaso conteniendo las plántulas se colocaron en jaulas de plástico individuales. A los 15 días después de la inoculación se colectaron de cada aislamiento urediniosporas aisladas, usando colectores especiales conectados a un compresor eléctrico y almacenándolas en cápsulas de gelatina. Con la finalidad de obtener inoculo suficiente y puro, las urediniosporas colectadas se incrementaron nuevamente en la variedad Apizaco, siguiendo el procedimiento antes descrito.

Para la identificación de los aislamientos se utilizaron un grupo de 16 genotipos de cebada enlistados en el Cuadro 1, los cuales fueron sembrados, por grupo, en charolas de plástico de 20 × 30 × 6 cm conteniendo una mezcla de tierra estéril y Peat moss en una proporción 60:40. Durante la siembra se



**Table 1. Genotypes used to identify isolates of *P. striiformis* f. sp. *hordei* in laboratory.**

**Cuadro 1. Genotipos utilizados para identificar los aislamientos de *P. striiformis* f. sp. *hordei* en laboratorio.**

| No. | Genotipo o variedad | No. | Genotipo o variedad |
|-----|---------------------|-----|---------------------|
| 1   | Heils Franken       | 9   | Armida              |
| 2   | Apizaco             | 10  | Doña Josefa         |
| 3   | Puebla              | 11  | ABI Growler         |
| 4   | Kaputar             | 12  | ABI Voyager         |
| 5   | Esmeralda           | 13  | AC Metcalfe         |
| 6   | Guanajuato          | 14  | Maravilla           |
| 7   | Esperanza           | 15  | Brennus             |
| 8   | Alina               | 16  | Meztli              |

in the substrate of each tray and 8 to 9 seeds were placed per genotype, originating the same number of seedlings; subsequently, 15 days after sowing, the group of genotypes were inoculated individually with each of the isolates (45) previously increased and following the methodology described above for the purification and increase of the inoculum. 15 days after inoculation, the reaction of the genotypes was recorded using the 0-9 scale described by Roelfs *et al.* (1992). For isolation designation, the abbreviation MEXC was used, which indicates that it is an isolation identified in Mexico in the barley crop, followed by the year and number of the registered isolation.

**Evaluation of genotypes in seedling.** At LANAREC, under greenhouse conditions (T min. 18 °C - T max. 20 °C), the seedling resistance of 15 advanced two-row barley lines from the Barley Genetic Breeding Program of INIFAP was evaluated. CEVAMEX and a control variety (Meztli). The 16 genotypes were sown in plastic trays, small holes were marked and 8 to 9 seeds per genotype were placed, 13 days after sowing the seedlings were inoculated with a suspension of urediniospores of the isolates MEXC/21.5 and MEXC/21.9, at a concentration of  $1 \times 10^6$

marcaron pequeños orificios en el sustrato de cada charola y se colocaron de 8 a 9 semillas por genotipo, originando igual número de plántulas; posteriormente, a los 15 días después de la siembra, el grupo de genotipos se inocularon individualmente con cada uno de los aislamientos (45) previamente incrementados y siguiendo la metodología descrita anteriormente para la purificación e incremento del inóculo. A los 15 días después de la inoculación se registró la reacción de los genotipos utilizando la escala del 0-9 descrita por Roelfs *et al.* (1992). Para la designación del aislamiento se utilizó la abreviatura MEXC que indica que es un aislamiento identificado en México en el cultivo de cebada, seguido del año y número de aislamiento registrado.

**Evaluación de genotipos en plántula.** En el LANAREC, bajo condiciones de invernadero (T min. 18 °C - T máx. 20 °C) se evaluó la resistencia en plántula de 15 líneas avanzadas de cebadas de dos hileras, provenientes del Programa de Mejoramiento Genético de Cebada del INIFAP-CEVAMEX y una variedad testigo (Meztli). Se sembraron los 16 genotipos en charolas de plástico, se marcaron pequeños orificios y se colocaron de 8 a 9 semillas por genotipo, posteriormente a los 13 días después de la siembra las plántulas se inocularon con una

urediniospores/mL<sup>-1</sup>. The MEXC/21.5 isolate was identified as the one with the lowest virulence spectrum, while MEXC/21.9 was one of the most virulent and frequent. The urediniospores were suspended in mineral oil (Soltrol® 170) and sprayed with an atomizer connected to a compressor. The inoculated seedlings were placed in a bioclimatic chamber with temperatures of 4-7 °C for 24 hours and dew at 100%. Subsequently, they were transferred to the greenhouse and 15 days after inoculation, the response to yellow rust was recorded on the 0-9 scale proposed by Roelfs *et al.* (1992), where the values of 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 are considered as a resistance reaction and 7, 8 and 9 as a susceptibility reaction.

**Evaluation of genotypes in the field.** The field evaluation was carried out during the spring-summer cycle of 2021 in three representative localities of the rainfed barley producing area of the Highland Valleys of Central Mexico: 1) Terrenate, Tlaxcala, located at 19° 26' 55.9" LN and 97° 56' 23.3" LW and at an altitude of 2,530 masl; 2) Nanacamilpa, Tlaxcala, at 19° 30' 8.3" LN, 98° 31' 9.6" LW and an altitude of 2,701 masl, 3) Chapingo, Texcoco, State of México, at 19° 29' 14.8" LN, 98 ° 53' 49.3" LW at 2,252 masl. The experimental design used was complete randomized blocks with 16 treatments (genotypes) and four repetitions, giving a total of 64 experimental units or plots for each location. The experimental unit consisted of four furrows three meters long and spaced at 30 cm, corresponding to a surface of 3.6 m<sup>2</sup>, considered a useful plot. Fifteen advanced lines were evaluated (three of them in the process of being described for their official registration with the National Seed Inspection and Certification Service - SNICS) and the Meztli variety, recently introduced to Mexico. All germplasm was from two rows. The incidence of yellow rust occurred naturally from the growth

suspensión de urediniosporas de los aislamientos MEXC/21.5 y MEXC/21.9, a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> urediniosporas mL<sup>-1</sup>. El aislamiento MEXC/21.5 se identificó como el de menor espectro de virulencia; mientras que MEXC/21.9 fue de los más virulentos y el de mayor frecuencia. Las urediniosporas fueron suspendidas en aceite mineral (Soltrol® 170) y asperjadas con un atomizador conectado a un compresor. Las plántulas inoculadas se colocaron en una cámara bioclimática con temperaturas de 4-7 °C por 24 horas y roció al 100%. Posteriormente se trasladaron al invernadero y después de 15 días de la inoculación se registró la respuesta a la roya amarilla en la escala del 0-9 propuesta por Roelfs *et al.* (1992), donde los valores de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se consideran como reacción de resistencia y 7, 8 y 9 reacción de susceptibilidad.

**Evaluación de genotipos en campo.** La evaluación en campo se realizó durante el ciclo primavera-verano del 2021 en tres localidades representativas de la zona productora de cebada de temporal de los Valles Altos de la Mesa Central de México: 1) Terrenate, Tlaxcala, ubicada a 19° 26' 55.9" de LN y 97° 56' 23.3" de LO y una altitud de 2 530 msnm; 2) Nanacamilpa, Tlaxcala, a 19° 30' 8.3" LN, 98° 31' 9.6" LO y una altura de 2 701 msnm, 3) Chapingo, Texcoco, Estado de México, a 19° 29' 14.8" LN, 98° 53' 49.3" LO a 2 252 msnm. El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar con 16 tratamientos (genotipos) y cuatro repeticiones, dando un total de 64 unidades experimentales o parcelas por cada localidad. La unidad experimental fue de cuatro surcos de tres metros de largo y espaciados a 30 cm, que corresponde a una superficie de 3.6 m<sup>2</sup>, considerada como parcela útil. Se evaluaron 15 líneas avanzadas (tres de ellas en proceso de descripción para su registro oficial ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de



stage of booting (development stage 41-49; Zadoks *et al.*, 1974) since the three locations present favorable climatic conditions for the development of the disease, such as cold to warm temperatures (5 to 18 °C) and the formation of dew. The registered variables were: 1) Days to heading (DE), days elapsed from sowing to the moment in which 50% of the plants presented visible spikes; 2) Days to physiological maturity (DM), days elapsed from sowing to the moment the spike peduncle turned hay yellow ; 3) Plant height (AP), height in centimeters from the soil surface to the tip of the terminal or higher spike; 4) Grain yield (REND), grain weight produced by all the spikes of each useful plot, registered in grams, which was subsequently transformed into kg ha<sup>-1</sup>; 5) Test weight (PH), grain weight per unit volume (kg hL<sup>-1</sup>); 6) Final disease severity (SFE), maximum level of damaged leaf area, registered as a percentage and using the scale suggested by Roelfs *et al.* (1992). With the severity readings taken in time intervals (three), the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated using the equation described by Bjarko and Line (1988). The data of the variables obtained in the three locations were analyzed statistically in jointly with the SAS 9.3 program (SAS, 2016) and mean comparisons were made for the variables under study using the DMS test ( $p \leq 0.01$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Virulence of *P. striiformis* f. sp. *hordei*

In the spring-summer 2021 cycle, nine isolates of *P. striiformis* f. sp. *hordei* were identified in seven locations in Tlaxcala, State of Mexico, and Hidalgo. These isolates are shown in Table 2, where MEXC/21.9, MEXC/21.16 and MEXC/21.23 were the most virulent, while MEXC/21.5 was the least virulent. All the isolates were avirulent in the Heils

Semillas - SNICS) y la variedad Meztli, de reciente introducción a México. Todo el germoplasma fue de dos hileras. La incidencia de la roya amarilla se presentó de forma natural a partir de la etapa de embuche (etapa de desarrollo 41-49; Zadoks *et al.*, 1974) ya que las tres localidades presentan condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad, como temperaturas de frías a templadas (5 a 18 °C) y la formación de rocío.

Se registraron las variables: 1) Días a espigamiento (DE), días transcurridos desde la siembra hasta el momento en que el 50% de las plantas presentaban espigas visibles; 2) Días a madurez fisiológica (DM), días transcurridos desde la siembra hasta el momento en que el pedúnculo de la espiga cambió a un color amarillo paja; 3) Altura de planta (AP), altura en centímetros desde la superficie del suelo hasta la punta de la espiguilla terminal de la espiga principal o superior; 4) Rendimiento de grano (REND), peso de grano producido por todas las espigas de cada parcela útil, registrado en gramos, la cual posteriormente se transformó en kg ha<sup>-1</sup>; 5) Peso hectolítrico (PH), peso del grano por unidad de volumen (kg hL<sup>-1</sup>); 6) Severidad final de la enfermedad (SFE), nivel máximo del área foliar dañada, registrada en porcentaje y utilizando la escala sugerida por Roelfs *et al.* (1992). Con las lecturas de severidad (tres) tomadas en intervalos de tiempo se calculó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) utilizando la ecuación descrita por Bjarko y Line (1988). Los datos de las variables obtenidas en las tres localidades fueron analizados estadísticamente de manera conjunta con el programa SAS 9.3 (SAS, 2016) y se realizaron comparaciones de medias para las variables en estudio mediante la prueba DMS ( $p \leq 0.01$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Virulencia de *P. striiformis* f. sp. *hordei*.** En el ciclo primavera-verano del 2021 se identificaron

**Table 2. Isolates of *P. striiformis* f. sp. *hordei* identified in the spring-summer/2021 cycle.**  
**Cuadro 2. Aislamientos de *P. striiformis* f. sp. *hordei* identificados en el ciclo P-V/2021.**

| No. | Aislamiento | Virulencia <sup>z</sup> | Avirulencia <sup>z</sup>          | Frecuencia (%) |
|-----|-------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 1   | MEXC/21.5   | 2,11                    | 1,3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16 | 9              |
| 2   | MEXC/21.7   | 2,3,4,11,12,13,16       | 1,5,6,7,8,9,10,14,15              | 13             |
| 3   | MEXC/21.9   | 2,3,4,6,11,12,13,16     | 1,5,7,8,9,10,14,15                | 27             |
| 4   | MEXC/21.10  | 2,4,11,12,13,16         | 1,3,5,6,7,8,9,10,14,15            | 11             |
| 5   | MEXC/21.11  | 2,3,4,6,11,12,13        | 1,5,7,8,9,10,14,15,16             | 7              |
| 6   | MEXC/21.16  | 2,3,4,5,6,11,12,13,16   | 1,7,8,9,10,14,15                  | 7              |
| 7   | MEXC/21.18  | 3,4,6,11,12,13,16       | 1,2,5,7,8,9,10,14,15              | 4              |
| 8   | MEXC/21.23  | 3,4,5,6,11,12,13,16     | 1,2,7,8,9,10,14,15                | 11             |
| 9   | MEXC/21.35  | 4,11,12,13,16           | 1,2,3,5,6,7,8,9,10,14,15          | 11             |

<sup>z</sup> The number refers to the barley genotypes indicated in Table 1. / <sup>z</sup>El número hace referencia a los genotipos de cebada indicados en el Cuadro 1.

Franken, Esperanza, Alina, Armida, Doña Josefa, Maravilla and Brennus genotypes, and virulent to ABI Growler.

Table 3 shows the isolates identified by locality and state, where it is observed that the greatest diversity (four isolates) was identified in Terrenate, Tlax. In this locality, the MEXC/21.9 isolate was also identified with greater frequency, 27%, and it was also identified in Nanacamilpa, Tlax. On the other hand, the isolate MEXC/21.18 was identified in Tlaxco, Tlax. and Apan, Hgo. It is worth mentioning that these locations are within the most important barley production areas in the states of Hidalgo and Tlaxcala.

nueve aislamientos de *P. striiformis* f. sp. *hordei* en siete localidades de Tlaxcala, Estado de México e Hidalgo. Dichos aislamientos se muestran en el Cuadro 2, donde se observa que el MEXC/21.9, MEXC/21.16 y MEXC/21.23 fueron los de mayor virulencia, mientras que el MEXC/21.5 fue el menos virulento. Todos los aislamientos fueron avirulentos en los genotipos Heils Franken, Esperanza, Alina, Armida, Doña Josefa, Maravilla y Brennus; y virulentos a ABI Growler.

En el Cuadro 3 se presentan los aislamientos identificados por localidad y estado, donde se observa que la mayor diversidad (cuatro aislamientos) se identificó en Terrenate, Tlax. En esta localidad

**Table 3. Isolates of *P. striiformis* f. sp. *hordei* identified in seven locations in Valles Altos during the spring-summer/2021 cycle.****Cuadro 3. Aislamientos de *P. striiformis* f. sp. *hordei* identificados en siete localidades de Valles Altos durante el ciclo P-V/2021.**

| Estado           | Localidad   | Aislamiento                                 |
|------------------|-------------|---------------------------------------------|
| Tlaxcala         | Terrenate   | MEXC/21.7, MEXC/21.9 MEXC/21.10, MEXC/21.35 |
|                  | Nanacamilpa | MEXC/21.9                                   |
|                  | Tlaxco      | MEXC/21.18, MEXC/21.9                       |
| Estado de México | Chapingo    | MEXC/21.5, MEXC/21.16                       |
|                  | Santa Lucia | MEXC/21.23                                  |
|                  | Toluca      | MEXC/21.11                                  |
| Hidalgo          | Apan        | MEXC/21.16, MEXC/21.18                      |

Barley yellow rust (Figure 1) did not exist in Mexico until 1986 and according to Calhoun *et al.* (1988) and Sandoval *et al.* (1999), during the summer of 1987, this disease was detected in the Highland Valleys of Central Mexico, by 1988 it caused yield losses of up to 50% as indicated by González *et al.* (2021). This epidemic was attributed mainly to race 24, which was characterized by its virulence for the Heils Franken genotype as indicated by Stubbs (1985) and Line (2002) and which possesses the resistance genes *Rps4* and *RpsHF*. None of the nine isolates identified showed virulence for Heils Franken; however, they share some similarity with race 23 previously identified by Stubbs (1985) and later reported by Marshall and Sutton (1995), this race is avirulent to Heils Franken. The virulence/avirulence results observed in Heils Franken suggest that the isolates identified in this study could be derived from race 23 and not from race 24.

The Esperanza, Alina, Armida and Maravilla barley varieties were resistant to all the isolates identified. Esmeralda was only susceptible to the isolates MEXC/21.16 and MEXC/21.23. This variety has been moderately resistant to yellow rust since its release and was described by Zamora *et al.* (1997) as the first variety developed in Mexico for rainfed conditions that has tolerance to yellow rust and that, until 2015, occupied 80% of the sown area of rainfed barley. However, González *et al.* (2021) indicate that INIFAP has obtained great achievements in varieties release, the most important being Esperanza and Esmeralda, which due to their resistance to stripe or yellow rust, allowed the production of barley for brewing both under irrigation and rainfed conditions; achieving national self-sufficiency in the year 2000.

**Response in seedling and adult plant.** Under controlled laboratory and greenhouse conditions,

también se identificó el aislamiento MEXC/21.9 con mayor frecuencia, 27%, y asimismo se identificó en Nanacamilpa, Tlax. Por otra parte, el aislamiento MEXC/21.18 se identificó en Tlaxco, Tlax. y Apan, Hgo. Cabe mencionar que estas localidades se encuentran dentro de las zonas de mayor importancia en producción de cebada de los estados de Hidalgo y Tlaxcala.

La roya amarilla de la cebada (Figura 1) no existía en México hasta antes de 1986 y de acuerdo con Calhoun *et al.* (1988) y Sandoval *et al.* (1999), durante el verano de 1987, esta enfermedad se detectó en los Valles Altos de la Mesa Central de México, para 1988 causó pérdidas de rendimiento hasta del 50% como lo indicaron González *et al.* (2021). Dicha epidemia fue adjudicada principalmente a la raza 24 que se caracterizó por su virulencia para el genotipo Heils Franken como lo indicaron Stubbs (1985) y Line (2002) y que posee los genes de resistencia *Rps4* y *RpsHF*. Ninguno de los nueve aislamientos identificados mostró virulencia para Heils Franken; sin embargo, comparten cierta similitud con la raza 23 previamente identificada por Stubbs (1985) y posteriormente reportada por Marshall y Sutton (1995), dicha raza es avirulenta a Heils Franken. Los resultados de virulencia/avirulencia observados en Heils Franken sugieren que los aislamientos identificados en este estudio podrían derivarse de la raza 23 y no de la raza 24.

Las variedades de cebada Esperanza, Alina, Armida y Maravilla fueron resistentes a todos los aislamientos identificados. Esmeralda solo fue susceptible a los aislamientos MEXC/21.16 y MEXC/21.23. Dicha variedad ha sido moderadamente resistente a roya amarilla desde su liberación, y fue descrita por Zamora *et al.* (1997) como la primera variedad desarrollada en México para condiciones de temporal que tiene tolerancia a la roya amarilla y que hasta el 2015 ocupaba el 80% de la superficie sembrada de cebada de temporal.





Figure 1. Symptoms of *P. striiformis* f. sp. *hordei* in seedling and adult plant in barley genotypes. A. Adult plants with susceptibility reaction; B. Adult plants with resistance reaction; C. Uredia in leaf of adult plant; D. Uredia and telia in grains and awns; E. Telias in sheath; F. Susceptibility response in the seedling stage; G. Uredias on seedling leaf.

Figura 1. Síntomas de *P. striiformis* f. sp. *hordei* en plántula y planta adulta en genotipos de cebada. A. Plantas adultas con reacción de susceptibilidad; B. Plantas adultas con reacción de resistencia; C. Uredias en hoja de planta adulta; D. Uredias y telias en granos y aristas; E. Telias en vaina; F. Respuesta de susceptibilidad en estado de plántula; G. Uredias en hoja de plántula.

the response was evaluated in seedlings of 15 lines and a two-row barley control variety. Table 4 shows the seedling response to two isolates, MEXC/21.9 with its virulence/avirulence formula: Apizaco, Puebla, Kaputar, Guanajuato, ABI Growler, ABI Voyager, AC Metcalfe, Meztli/Heils Franken, Esmeralda, Esperanza, Alina, Armida, Doña Josefa, Maravilla, Brennus; and MEXC/21.5: Apizaco, ABI Growler/Heils Franken, Puebla, Kaputar, Esmeralda, Guanajuato, Esperanza, Alina, Armida, Doña Josefa, ABI Voyager, AC Metcalfe, Maravilla, Brennus, Meztli. Lines L-3, L-4, L-5 and the Meztli variety were susceptible to the two isolates evaluated, and L-10 was only susceptible to the MEXC/21.5 isolate. In 80% of the lines evaluated, a resistance response was observed with readings of 0 to 6 of infection according to the scale of Roelfs *et al.* (1992).

Regarding resistance in adult plants, Table 4 indicates the percentage of final severity observed in the towns of Terrenate and Nanacamilpa,

No obstante González *et al.* (2021) indican que el INIFAP ha obtenido grandes logros en la liberación de variedades, siendo las más importantes Esperanza y Esmeralda que por su resistencia a roya lineal o amarilla, permitieron la producción de cebada para cervecería tanto en condiciones de riego como de temporal; logrando la autosuficiencia nacional en el año 2000.

**Respuesta en plántula y planta adulta.** Bajo condiciones controladas en laboratorio e invernadero, se evaluó la respuesta en plántula de 15 líneas y una variedad testigo de cebada de dos hileras. En el Cuadro 4 se presenta la respuesta en plántula a dos aislamientos, MEXC/21.9 con su fórmula de virulencia/avirulencia: Apizaco, Puebla, Kaputar, Guanajuato, ABI Growler, ABI Voyager, AC Metcalfe, Meztli/Heils Franken, Esmeralda, Esperanza, Alina, Armida, Doña Josefa, Maravilla, Brennus; y MEXC/21.5: Apizaco, ABI Growler/Heils Franken, Puebla, Kaputar, Esmeralda, Guanajuato,

**Table 4. Response in seedling and adult plant to *P. striiformis* f. sp. *hordei* in 16 two-row barley genotypes. Cuadro 4. Respuesta en plántula y planta adulta a *P. striiformis* f. sp. *hordei* en 16 genotipos de cebada de dos hileras.**

| Línea             | Resistencia en plántula |           | Resistencia en planta adulta |                    |                    |
|-------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|--------------------|--------------------|
|                   | MEXC/21.9               | MEXC/21.5 | Terrenate, Tlax.             | Nanacamilpa, Tlax. | Chapingo, Edo. Mex |
| L-1               | 4                       | 5         | 10MS <sup>z</sup>            | 10MS               | 5MR                |
| L-2               | 5                       | 6         | 1R                           | 0R                 | 0R                 |
| L-3               | 7                       | 7         | 20MS                         | 10MS               | 5MR                |
| L-4               | 8                       | 7         | 15MS                         | 5MR                | 5MR                |
| L-5               | 7                       | 7         | 5MR                          | 5MR                | 5MR                |
| L-6               | 4                       | 5         | 5MR                          | 0MR                | 0MR                |
| L-7               | 4                       | 4         | 10MS                         | 1R                 | 0R                 |
| L-8               | 4                       | 5         | 0R                           | 1R                 | 0R                 |
| L-9               | 3                       | 5         | 0R                           | 5MR                | 0R                 |
| L-10              | 4                       | 8         | 0R                           | 0R                 | 0R                 |
| L-11              | 5                       | 6         | 0R                           | 0R                 | 0R                 |
| L-12              | 4                       | 4         | 5MR                          | 1MR                | 0R                 |
| L-13 (Salome "s") | 4                       | 3         | 1R                           | 0R                 | 0R                 |
| L-14 (Frida "s")  | 4                       | 4         | 0R                           | 5MR                | 5MR                |
| L-15 (Alexia "s") | 4                       | 4         | 0R                           | 0R                 | 0R                 |
| Meztli            | 7                       | 7         | 15MS                         | 10MS               | 5MS                |

<sup>z</sup> R=Resistant; MR=Moderate Resistance; MS=Moderate Susceptibility.

Tlaxcala and Chapingo, Texcoco, State of Mexico. Most of the lines evaluated showed satisfactory levels of resistance in adult plants with readings of 0 to 10% infection. Lines 3 and 4 were moderately resistant to moderately susceptible, with readings of 15 to 20% infection. The control variety (Meztli) was moderately resistant to moderately susceptible (5 to 15% severity), it should be noted that it is a recently introduced variety for cultivation under the two planting conditions in Mexico (irrigated and rainfed) and it is likely that share a similarity with the germplasm introduced from other countries (USA and Canada) by the brewing consortia, for which its observed resistance levels are not satisfactory. In the candidate lines for release (Frida "s" and Alexia "s") good resistance was observed to *P. striiformis* f. sp. *hordei* in seedlings, as well as in adult plants in all evaluation locations.

Based on the resistance response to yellow rust observed in the evaluated genotypes, it can be inferred that monogenic resistance predominates over polygenic resistance in the barley program, since of the 15 lines evaluated, 10 were resistant in seedlings and adult plants; however, three lines were also identified (L-3, L-4 and L-5) that were susceptible in seedlings while in adult plants they were moderately resistant to moderately susceptible, which infers that they have polygenic type resistance. The results shown coincide with what was reported by Sandoval *et al.* (1999; 2007); Niks (2014); Gangwar *et al.* (2018) who indicate that in the barley-yellow rust pathosystem, two types of resistance have been identified; seedling resistance, which is correlated in the adult plant, and partial resistance, which is characterized by presenting susceptible seedlings, but low percentages of damaged leaf area in the adult plant.

**Agronomic behavior.** In barley as in other crops, agronomic variables are the main factors to consider when generating and releasing a variety,

Esperanza, Alina, Armida, Doña Josefa, ABI Voyager, AC Metcalfe, Maravilla, Brennus, Meztli. Las líneas L-3, L-4, L-5 y la variedad Meztli fueron susceptibles a los dos aislamientos evaluados, y la L-10 solamente fue susceptible al aislamiento MEXC/21.5. En el 80% de las líneas evaluadas se observó respuesta de resistencia con lecturas de 0 a 6 de infección según la escala de Roelfs *et al.* (1992).

En cuanto a resistencia en planta adulta en el Cuadro 4, se indican el porcentaje de severidad final observado en las localidades de Terrenate y Nancamilpa, Tlaxcala y Chapingo, Texcoco, Estado de México. La mayoría de las líneas evaluadas mostró niveles satisfactorios de resistencia en planta adulta con lecturas de 0 a 10% de infección. Las líneas 3 y 4 fueron moderadamente resistentes a moderadamente susceptibles, con lecturas del 15 a 20% de infección. La variedad testigo (Meztli) fue moderadamente resistente a moderadamente susceptible (5 a 15% de severidad), cabe indicar que es una variedad de reciente introducción para su cultivo en las dos condiciones de siembra en México (riego y temporal) y es probable que comparta similitud con el germoplasma introducido de otros países (EUA y Canadá) por los consorcios cerveceros por lo cual sus niveles de resistencia observados no son satisfactorios. En las líneas candidatas a liberación (Frida "s" y Alexia "s") se observó buena resistencia a *P. striiformis* f. sp. *hordei* en plántula, así como también en planta adulta en todas las localidades de evaluación.

Con base a la respuesta de resistencia a roya amarilla observada en los genotipos evaluados, se puede inferir que en el programada de cebada predomina la resistencia monogénica sobre la resistencia poligénica, ya que de las 15 líneas evaluadas, 10 fueron resistentes en plántula y planta adulta; no obstante, también se identificaron tres líneas (L-3, L-4 y L-5) que fueron susceptibles en plántula mientras que en planta adulta fueron de moderadamente



so evaluating the agronomic behavior in the field allows us to observe the potential of each genotype. Table 5 shows the comparison of means by location of the variables days to heading (DE), days to maturity (DM), plant height (AP), test weight (PH) and grain yield (REND) of the 15 lines and control variety. For DE, the town of Chapingo was where the genotypes expressed greater earliness. For DM, Nanacamilpa and Terrenate were statistically the same; in both locations, the crop cycle was longer, unlike Chapingo, where the average physiological maturity of the germplasm was 105 days. Similar results were reported by González *et al.* (2016), who indicate that the specific conditions of each environment determine the duration of the crop cycle. Regarding AP, in the town of Terrenate the largest plant sizes were observed and the smallest in Nanacamilpa (Table 5). For PH, the highest values for this variable were obtained in Chapingo (61.06 kg hL<sup>-1</sup>), followed by Nanacamilpa (59.49 kg hL<sup>-1</sup>). Only the town of Terrenate registered an average PH value lower than what is established in the standard for the commercialization of the products. According to González *et al.* (2013), the test weight (PH) is a quality factor related to the texture of the endosperm or the protein content

resistentes a moderadamente susceptibles, con lo que se infiere que poseen resistencia de tipo poligénica. Los resultados mostrados coinciden con lo reportado por Sandoval *et al.* (1999; 2007); Niks (2014); Gangwar *et al.* (2018) quienes indican que en el patosistema cebada-roya amarilla, se han identificado dos tipos de resistencia; la resistencia en plántula, la cual esta correlacionada en planta adulta y la resistencia parcial, la cual se caracteriza por presentar plántulas susceptibles, pero porcentajes bajos de área foliar dañada en planta adulta.

**Comportamiento agronómico.** En cebada como en otros cultivos, las variables agronómicas son los principales factores a considerar cuando se genera y libera una variedad, por lo que evaluar el comportamiento agronómico en campo permite observar el potencial de cada genotipo. En el Cuadro 5 se presenta la comparación de medias por localidad de las variables días a espigamiento (DE), días a madurez (DM), altura de planta (AP), peso hectolítrico (PH) y rendimiento de grano (REND) de las 15 líneas y variedad testigo. Para DE la localidad de Chapingo fue en donde los genotipos expresaron mayor precocidad. Para DM en Nanacamilpa y Terrenate fueron estadísticamente iguales; en ambas

**Table 5. Comparison of means of the agronomic behavior of 16 two-row barley genotypes in three locations in Tlaxcala and State of Mexico, during the Spring-Summer cycle, 2021.**  
**Cuadro 5. Comparación de medias del comportamiento agronómico de 16 genotipos de cebada de dos hileras en tres localidades de Tlaxcala y Edo. De México, durante el ciclo Primavera-Verano, 2021.**

| Localidades | Días a espigamiento | Días a madurez fisiológica | Altura de planta | Peso hectolítrico (kg ha <sup>-1</sup> ) | Rendimiento de grano means <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---------------------|----------------------------|------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Chapingo    | 52 c <sup>z</sup>   | 105 b                      | 92 b             | 61.06 a                                  | 5282 a                                     |
| Nanacamilpa | 64 a                | 126 a                      | 78 c             | 59.49 b                                  | 4356 b                                     |
| Terrenate   | 61 b                | 121 a                      | 104 a            | 55.57 c                                  | 4166 b                                     |
| media       | 59                  | 117                        | 91               | 58.71                                    | 46012                                      |
| DMS         | 0.75                | 6.41                       | 6.94             | 0.60                                     | 253.15                                     |

<sup>z</sup>Means with the same letter within columns are not statistically different (DMS,  $p \leq 0.01$ ). / <sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son estadísticamente diferentes (DMS,  $p \leq 0.01$ ).



of the grain, being a very important parameter in the industrialization of malting barley because its values directly influence the performance and quality of finished products. The grain yield (REND) was higher in Chapingo with 5,282 kg ha<sup>-1</sup>; for the towns of Nanacamilpa and Terrenate, no significant statistical differences were observed in the yield obtained. In general, the best agronomic performance was observed in Chapingo, State of Mexico, and although the best PH and yield values were recorded in this locality, these variables are not correlated. However, genotypes with high values for these two variables are preferred.

Table 6 shows the comparison of means for the 16 genotypes including the control variety, where statistical differences are observed between them for all the variables evaluated. For days to heading

localidades el ciclo de cultivo fue más largo a diferencia de Chapingo donde en promedio la madurez fisiológica del germoplasma fue de 105 días. Resultados similares fueron reportados por González *et al.* (2016), quienes indican que las condiciones específicas de cada ambiente determinan la duración del ciclo de cultivo. En cuanto a AP, en la localidad de Terrenate se observaron los mayores portes de planta y los menores en Nanacamilpa (Cuadro 5). Para PH los valores más altos para esta variable fueron obtenidos en Chapingo (61.06 kg hL<sup>-1</sup>), seguido de Nanacamilpa (59.49 kg hL<sup>-1</sup>). Únicamente la localidad de Terrenate registró un valor promedio de PH inferior a lo establecido en la norma para la comercialización de los productos. De acuerdo con González *et al.* (2013), el peso hectolítrico (PH) es un factor de calidad que se le relaciona con la

**Table 6. Comparison of means in 16 two-row barley lines for the variables DE, DM, AP, PH, REND, SFE and AUDPC from three locations during the Spring-Summer cycle, 2021.**

**Cuadro 6. Comparación de medias en 16 líneas de cebada de dos hileras para las variables DE, DM, AP, PH, REND, SFE y ABCPE de tres localidades durante el ciclo Primavera-Verano, 2021.**

| Línea                         | Días a espigamiento | Días a madurez fisiológica | Altura de planta | Peso hectolítrico (kg hL <sup>-1</sup> ) | Rendimiento de grano (kg ha <sup>-1</sup> ) | Severidad final de la enfermedad | ABCPE <sup>y</sup>   |
|-------------------------------|---------------------|----------------------------|------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| L-1                           | 59 de               | 117 bcd                    | 92 cdef          | 58.03 cdef                               | 3611 gh                                     | 4.3 bc                           | 46.3 cd <sup>z</sup> |
| L-2                           | 60 cd               | 117 bcd                    | 91 def           | 57.06 f                                  | 3864 gh                                     | 0.2 d                            | 2.5 d                |
| L-3                           | 56 h                | 110 gh                     | 99 a             | 58.30 cdef                               | 4899 de                                     | 7.7 b                            | 102.5 ab             |
| L-4                           | 58 efgh             | 114 defg                   | 97 ab            | 59.16 bcdef                              | 3653 gh                                     | 3.7 cd                           | 55.0 bc              |
| L-5                           | 59 de               | 116 bcdef                  | 92 bcdef         | 58.47 cdef                               | 3465 h                                      | 1.8 cd                           | 26.3 cd              |
| L-6                           | 57 gh               | 112 efg                    | 95 abcd          | 60.14 bc                                 | 3935 g                                      | 1.0 cd                           | 15.0 cd              |
| L-7                           | 59 de               | 118 bcd                    | 93 bcdef         | 59.67 bcde                               | 5442 bc                                     | 2.0 cd                           | 28.8 cd              |
| L-8                           | 62 b                | 120 b                      | 89 f             | 59.54 bcde                               | 6097 a                                      | 0.2 d                            | 1.3 d                |
| L-9                           | 60 bcd              | 120 b                      | 92 cdef          | 57.54 ef                                 | 5776 ab                                     | 0.3 d                            | 2.5 d                |
| L-10                          | 61 bc               | 117 bcd                    | 96 abc           | 57.76 ef                                 | 4456 f                                      | 0.0 d                            | 0.0 d                |
| L-11                          | 57 gh               | 114 defg                   | 95 abcd          | 60.95 ab                                 | 4374 f                                      | 0.0 d                            | 0.0 d                |
| L-12                          | 52 i                | 112 efg                    | 83 g             | 60.01 bcd                                | 4539 ef                                     | 1.0 cd                           | 11.3 cd              |
| L-13 (Salome s <sup>™</sup> ) | 49 j                | 106 h                      | 77 h             | 63.12 a                                  | 3792 gh                                     | 0.2 d                            | 2.5 d                |
| L-14 (Frida s <sup>™</sup> )  | 62 b                | 119 b                      | 94 bcde          | 58.42 cdef                               | 5706 ab                                     | 1.0 cd                           | 8.8 cd               |
| L-15 (Alexia s <sup>™</sup> ) | 62 b                | 119 b                      | 91 ef            | 58.35 cdef                               | 5119 cd                                     | 0.0 d                            | 0.0 d                |
| Meztli                        | 71 a                | 141 a                      | 83 g             | 53.71 g                                  | 4896 de                                     | 14.2 a                           | 145 a                |
| DMS                           | 1.98                | 4.69                       | 4.45             | 2.20                                     | 433.47                                      | 3.96                             | 49.75                |

<sup>y</sup>AUDPC = area under the disease progress curve. <sup>z</sup> Means with the same letter within columns are not statistically different (DMS,  $p \leq 0.01$ ). / <sup>y</sup>ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad. <sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son estadísticamente diferentes (DMS,  $p \leq 0.01$ ).

(DE) line 13 (L-13) was the earliest (49 days), while the latest (71) was the control variety Meztli. For days to maturity (DM) L-3 and L-13 were the earliest, while Meztli (control) was the latest; the late cycle shown in the control is commonly observed in the introduced materials (Rodríguez *et al.*, 2021) and recommended by the brewing consortiums. It is likely that the main cause is they were not generated for the growing conditions present in Mexico. For plant height (AP), the L-3 was the largest (99 cm), the rest of the genotypes had smaller sizes in relation to this line, with the L-13 line being the genotype with the lowest plant height. According to González *et al.* (2016) these plant sizes are considered intermediate and suitable for growing barley, higher heights than those registered here favor lodging problems and subsequent problems during harvest. The L-13 was the one that registered the highest test weight (PH) on average (63.12 kg hL<sup>-1</sup>), followed by L-11, while the lowest value was observed in Meztli (53.71 kg hL<sup>-1</sup>), being 10 units lower than the value obtained in the best line, which represents a 17% superiority of the experimental line over the control. The registered PH values show a great variation between the germplasm evaluated as a response of the genotype to the production environment (Kangor *et al.*, 2017; González *et al.*, 2016). Regarding grain yield, six lines outperformed the commercial control. The highest yields were observed in L-8 (6,097 kg ha<sup>-1</sup>), L-9 (5,776 kg ha<sup>-1</sup>) and L-14 (5,706 kg ha<sup>-1</sup>), which were statistically equal. The L-8 line yielded 1,200 kg more than the control Meztli, which was equivalent to 24.5% more gain. Regarding Final Disease Severity (SFE) and Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC), Meztli was the variety where the highest values were observed (145), followed by L-3 and L-1 for these variables (Table 6).

In general, most of the lines evaluated showed adequate agronomic and physical characteristics,

textura del endospermo o con el contenido de proteína del grano, siendo un parámetro muy importante en la industrialización de la cebada maltera debido a que sus valores influyen directamente en el rendimiento y calidad de los productos terminados. El rendimiento de grano (REND) fue superior en Chapingo con 5,282 kg ha<sup>-1</sup>; para las localidades de Nanacamilpa y Terrenate no se observaron diferencias estadísticas significativas en el rendimiento obtenido. En general, el mejor comportamiento agronómico fue observado en Chapingo, Estado de México, y aunque en esta localidad se registraron los mejores valores de PH y rendimiento, estas variables no están correlacionadas. Sin embargo, se prefieren genotipos con valores altos para estas dos variables.

En el Cuadro 6 se presenta la comparación de medias para los 16 genotipos incluida la variedad testigo, donde se observan diferencias estadísticas entre ellas para todas las variables evaluadas. Para días a espigamiento (DE) la línea 13 (L-13) fue la más precoz (49 días), mientras que la más tardía (71) fue la variedad testigo Meztli. Para días a madurez (DM) la L-3 y L-13 fueron las más precoces, mientras que Meztli (testigo), fue la más tardía; el ciclo tardío mostrado en el testigo es común observarlo en los materiales introducidos (Rodríguez *et al.*, 2021) y recomendados por los consorcios cerveceros. Es probable que la causa principal sea debido a que no fueron generados para las condiciones de cultivo presentes en México. Para altura de planta (AP), la L-3 fue la de mayor porte (99 cm), el resto de los genotipos tuvieron portes menores con relación a esta línea, siendo la línea L-13 el genotipo con la menor altura de planta. De acuerdo con González *et al.* (2016) estos portes de planta son considerados intermedias y adecuadas para el cultivo de cebada, alturas con mayor porte que las aquí registradas favorecen problemas de acame y posteriores problemas durante la cosecha. La L-13 fue la que en promedio registró el peso hectolítrico

of which grain yield and hectoliter weight are the most important parameters for choosing the genotypes that can be released. In accordance with the NMX-FF-043-SCFI-2003 standard, the minimum value of two-row barley to be considered for brewing industrialization will be 58 kg hL<sup>-1</sup>. Of the 15 lines evaluated, 12 of them on average presented test weight values according to the established standard.

Few studies have been reported in Mexico that focus on evaluating the pathogenic variability of *P. striiformis* in barley; however, in recent agricultural cycles yellow rust is occurring more frequently in the country, as mentioned by Rodríguez *et al.* (2019). In other countries such as the USA, Chen and Penman (2005) report the presence of 15 physiological races that they identified in 2004 in California and Oregon. Subsequently, Wang and Chen (2012) detected the presence of 11 physiological races in 2008 and five in 2009 in Oregon and Washington. Wang and Chen (2019) reported the presence of 12 races primarily identified in the western USA. Studies conducted by Prashar *et al.* (2014) reported five pathotypes for India, while Safavi *et al.* (2017) identified the presence of 10 physiological races in Iran. Recently Bai *et al.* (2022), mention that in the United States the pathogenic diversity of *P. striiformis* increased from 2010 to 2017, observing rapid changes in virulence from one year to the next. Given this evidence, it is essential to monitor the pathogenic variability of *P. striiformis*, which will allow any change in virulence to be known in time, being an important strategy to consider in breeding programs as indicated by Rodríguez *et al.* (2010) who, when analyzing the virulence of yellow rust in wheat crops, highlight the importance of identifying physiological races of the pathogen, being a useful tool in genetic improvement, which allows creating and releasing new varieties with the most effective genetic combinations for disease control.

(PH) más alto (63.12 kg hL<sup>-1</sup>), seguido de la L-11, mientras que el menor valor se observó en Meztli (53.71 kg hL<sup>-1</sup>), siendo 10 unidades inferior al valor obtenido en la mejor línea lo cual representa un 17% de superioridad de la línea experimental sobre el testigo. Los valores de PH registrados muestran una gran variación entre el germoplasma evaluado como respuesta del genotipo al ambiente de producción (Kangor *et al.*, 2017; González *et al.*, 2016). En cuanto al rendimiento de grano, seis líneas superaron en rendimiento al testigo comercial. Los rendimientos más altos se observaron en L-8 (6,097 kg ha<sup>-1</sup>), L-9 (5,776 kg ha<sup>-1</sup>) y L-14 (5,706 kg ha<sup>-1</sup>) las cuales fueron estadísticamente iguales. La línea L-8 rindió 1,200 kg más que el testigo Meztli lo que equivalió a un 24.5% más de ganancia. En cuanto a Severidad Final de la Enfermedad (SFE) y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), Meztli fue la variedad en donde se observaron los valores más altos (145), seguido de la L-3 y L-1 para estas variables (Cuadro 6).

En general la mayoría de las líneas evaluadas mostraron adecuadas características agronómicas y físicas, de las cuales, el rendimiento de grano y el peso hectolítrico, son los parámetros de mayor importancia para elegir a los genotipos que podrán ser liberados. De acuerdo con la norma NMX-FF-043-SCFI-2003 las cebadas de dos hileras para ser consideradas en la industrialización cervecera, su valor mínimo será de 58 kg hL<sup>-1</sup>. De las 15 líneas evaluadas, 12 de ellas en promedio presentaron valores de peso hectolítrico conforme a la norma establecida.

En México se han reportado pocos estudios que se enfoquen a evaluar la variabilidad patogénica de *P. striiformis* en cebada; sin embargo, en los últimos ciclos agrícolas la roya amarilla se está presentando con mayor frecuencia en el país, como lo mencionan Rodríguez *et al.* (2019). En otros países como EUA, Chen y Penman (2005), reportan la presencia 15 razas fisiológicas que identificaron en

Due to its resistance in the field to *P. striiformis* f. sp. *hordei*, under natural incidence, lines L-10, L-11 and L-15 were identified as immune; however, in general, the resistance levels observed in most two-row barley lines are satisfactory. These results coincide with what was reported by Xi *et al.* (2013) who indicated that, when evaluating two-row and six-row barley germplasm, they found a greater number of two-row genotypes with resistance to yellow rust. However, in the INIFAP barley improvement program, in recent years the germplasm obtained has been tested for natural infection in the field and in the greenhouse with selected isolates. This strategy has allowed the selection of lines with high resistance levels, this strategy used in Mexico is also applied in barley improvement programs in various countries, including the USA, as mentioned by Chen (2007). On the other hand, Brown *et al.* (2001) indicated that genetic resistance is an effective, practical and economic mean for the management of barley yellow rust. Ambula *et al.* (2022) also indicated that genetic resistance is an effective alternative if resistant genotypes are incorporated into the new varieties, allowing to improve the productivity of the barley crop by reducing the effects of rusts. Furthermore, Czembor *et al.* (2022) mention that adult plant resistance (APR) is potentially more durable and effective for disease control in barley, avoiding yield losses.

Considering the variability of *P. striiformis* f. sp. *hordei* present in Mexico and the level of resistance that the varieties and lines have, it is important to continue with the evaluation and rotation of germplasm in contrasting environments to avoid the decrease in resistance already obtained in breeding programs.

2004 en California y Oregón. Posteriormente Wang y Chen (2012) detectaron la presencia de 11 razas fisiológicas en 2008 y cinco en 2009 en Oregón y Washington. Wang y Chen (2019) indicaron la presencia de 12 razas principalmente identificada en el oeste de EUA. Estudios realizados por Prashar *et al.* (2014) reportaron para la India cinco patotipos; mientras que Safavi *et al.* (2017) identificaron la presencia de 10 razas fisiológicas en Irán. Recientemente Bail *et al.* (2022), mencionan que en Estados Unidos la diversidad patogénica de *P. striiformis* fue en aumento del 2010 al 2017 observándose cambios rápidos de virulencia de un año a otro. Ante estas evidencias, es imprescindible monitorear la variabilidad patogénica *P. striiformis* lo que permitirá conocer en tiempo cualquier cambio de virulencia siendo una estrategia importante a considerar en los programas de mejoramiento como lo indican Rodríguez *et al.* (2010) quienes al analizar la virulencia de la roya amarilla en el cultivo de trigo resaltan la importancia en la identificación de razas fisiológicas del patógeno siendo una herramienta útil en el mejoramiento genético, que permite crear y liberar nuevas variedades con las combinaciones genéticas más efectivas para el control de la enfermedad.

Por su resistencia en campo a *P. striiformis* f. sp. *hordei*, bajo incidencia natural, las líneas L-10, L-11 y L-15 fueron identificadas como inmunes; sin embargo, en general, los niveles de resistencia observados en la mayoría de las líneas de cebada de dos hileras son satisfactorios. Dichos resultados coinciden con lo reportado por Xi *et al.* (2013) quienes indicaron que, al evaluar germoplasma de cebada de dos y seis hileras, encontraron un mayor número de genotipos de dos hileras con resistencia a roya amarilla. No obstante, en el programa de

## CONCLUSIONS

Nine yellow rust isolates of barley were identified in the spring-summer/2021 cycle. No virulence was identified for the Heils Franken genotype, therefore race 24 was not detected. Most of the two-row barley lines showed monogenic resistance. Line L-8 was the one with the highest yield potential and resistance to yellow rust in seedlings and adult plants. Alexia “s” is the candidate line with immunity to yellow rust. The evaluation of resistance in the greenhouse and in the field under contrasting environments is a viable strategy for the identification of germplasm resistant to yellow rust in barley that will allow the release of varieties with genetic resistance.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research funded by the project: Genetic improvement of barley to obtain high productivity and disease tolerant forage lines. SIGI No: 12532434778.

## CITED LITERATURE

- Ambula KV, James O and Charimbu MK. 2022. Evaluation of advanced Kenyan barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn.) race Ttksk and its variants. *Journal of Experimental Agriculture International* 44(9):10-20. <https://doi.org/10.9734/JEAI/2022/v44i930844>
- Bail Q, Liu T, Wan A, Wang M, See DR and Chen X. 2022. Changes of barley stripe rust populations in the United States from 1993 to 2017. *Phytopathology* 112(11):2391-2402. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-22-0135-R>
- Bjarko ME and Line RF. 1988. Heritability and number of genes controlling leaf rust resistance in four cultivars of wheat. *Phytopathology* 78:457-461.
- Brown WM, Hill JP and Velasco VR. 2001. Barley yellow rust in North America. *Annual Review of Phytopathology* 39:367-384.
- Calhoun DS, Luna A and Vivar FHE. 1988. Chemical control of barley stripe rust, a new disease for North America. *Barley Newsletter* 32:109-112.
- Czembor JH, Czembor E, Suchecki R and Watson HNS. 2022. Genome wide association study for Power Mildew and rust adult plant resistance in European spring barley from polish gene bank. *Agronomy* 12(7):1-24. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010007>
- mejoramiento de cebada del INIFAP en los últimos años el germoplasma obtenido se ha probado bajo infección natural en campo e invernadero con aislamientos seleccionados. Dicha estrategia ha permitido seleccionar líneas con niveles de resistencia altos, esta estrategia utilizada en México también se aplica en los programas de mejoramiento de cebada de diversos países, entre ellos EUA, como lo menciona Chen (2007). Por otra parte, Brown *et al.* (2001) indicaron que la resistencia genética es un medio efectivo, práctico y económico para el manejo de la roya amarilla de la cebada. Ambula *et al.* (2022) también indicaron que la resistencia genética es una alternativa efectiva si se incorporan en las nuevas variedades los genotipos resistentes, permitiendo mejorar la productividad del cultivo de cebada al reducir los efectos de las royas. Además, Czembor *et al.* (2022) mencionan que la resistencia en planta adulta (RPA) es potencialmente más durable y efectiva para el control de enfermedades en cebada evitando pérdidas en el rendimiento. Considerando la variabilidad de *P. striiformis* f. sp. *hordei* presente en México y el nivel de resistencia que poseen las variedades y líneas, es importante continuar con la evaluación y rotación de germoplasma en ambientes contrastantes para evitar la disminución en la resistencia ya obtenida en los programas de mejoramiento.

## CONCLUSIONES

Se identificaron nueve aislamientos de roya amarilla de la cebada en el ciclo P-V/2021. No se identificó virulencia para el genotipo Heils Franken por lo cual no se detectó la raza 24. Las líneas de cebada de dos hileras en su mayoría mostraron resistencia monogénica. La línea L-8, fue la de mayor potencial de rendimiento y resistente a roya amarilla en plántula y planta adulta. Alexia “s” es la línea candidata con inmunidad a roya amarilla.



- Chen XM 2007. Challenges and solutions for stripe rust control in the United States. Australian Journal of Agricultural Research 58:648-655. <https://doi.org/10.1071/AR07045>
- Chen X and Line RF. 2002. Identification of genes for resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* in 18 barley genotypes. Euphytica 129(1):127-145. <https://doi.org/10.1023/A:1021585907493>
- Chen X and Penman L. 2005. Races of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, the pathogen of barley stripe rust in the United States in 2004. Barley Genetics Newsletter 35:23-26
- Dean R, Kan JALV, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Pietro Ad, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13(4):414-430. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X>
- Dubin HJ and Stubbs RW. 1986. Epidemic spread of barley stripe rust in South America. Plant Disease 70(2):141-144.
- Gangwar OP, Bhardwaj SC, Singh GP, Prasad P and Kumar S. 2018. Barley disease and their management: An Indian perspective. Wheat and Barley Research 10(3):138-150. <https://doi.org/10.25174/22494065/2018/83844>
- González GM, Zamora DM, Huerta ZR y Solano HS. 2013. Eficacia de tres fungicidas para controlar roya de la hoja en cebada maltera. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4(8):1237-1250. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n8/v4n8a10.pdf>
- González GM, Zamora DM y Solano HS. 2016. Evaluación agronómica y física en líneas avanzadas de cebada maltera. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(1): 159-171. <http://www.scielo.org.mx/pdf/>
- González GM, Zamora DM, Solano HS, Huerta ZR, Gómez MR y Rojas MI. 2021. Mejoramiento genético de cebada en el INIFAP (1985-2020). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas PE (25):15-19. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i25.2807>
- Hamwih A, Alo F and Ahmed S. 2018. Molecular Tools Developed for disease resistant genes in wheat, barley, lentil and chickpea: A Review. Arab Journal of Plant Protection 36(1):50-56. <https://doi.org/10.22268/AJPP-036.1.050056>
- Kangor T, Sooväli P, Tamm Y, Tamm I and Koppel M. 2017. Malting Barley Diseases, yield and quality-responses to using various agro-technology regimes. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences 71(1-2): 57-62. <https://doi.org/10.1515/prolas-2017-0010>
- Line RF. 2002. Stripe rust of wheat and barley in North America: A retrospective historical review. Annual Review of Phytopathology 40:75-118. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.020102.111645>
- Marshall D and Sutton RL. 1995. Epidemiology of stripe rust, virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, and yield loss in barley. Plant Disease 79(7):732-737.
- Niks RE. 2014. How Specific is Non-Hypersensitive Host and Nonhost Resistance of Barley to Rust and Mildew Fungi?

La evaluación de la resistencia en invernadero y en campo bajo ambientes contrastantes es una estrategia viable para la identificación de germoplasma resistente a roya amarilla en cebada que permitirá liberar variedades con resistencia genética.

#### AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada por el proyecto: Mejoramiento genético de cebada para obtener líneas forrajeras de alta productividad y tolerantes a enfermedades. No. SIGI: 12532434778.

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

- Journal of Integrative Agriculture 13(2):244-254. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60648-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60648-6)
- Prashar M, Bhardwaj SC, Gangwar OP and Jain SK. 2014. Virulence distribution and frequency of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, causing stripe rust of barley in norther parts of India. Indian Phytopathology 67(1):38-41.
- Rodríguez GMF, González GM, Huerta EJ and Solano HS. 2021. Fungicides evaluation against yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) in six barley cultivars. Mexican Journal of Phytopathology 39(3):414-434. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-5>
- Rodríguez GMF, González GM, Huerta EJ, Solano HS y Villaseñor MHE. 2019. Evaluación de fungicidas para el control de la roya lineal amarilla en cebada. Revista Mexicana de Fitopatología 37(Suplemento): S89. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen372019/S372019.pdf>
- Rodríguez GMF, Huerta EJ, Villaseñor MHE, Sandoval IJS y Singh RP. 2010. Análisis de virulencia de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los Valles Altos de México. Agrociencia 44(4):491-502.
- Roelfs AP, Huerta-Espino J and Marshall D. 1992. Barley stripe rust in Texas. Plant Disease 76:538.
- Safavi SA, Afshari F and Arzanlou M. 2017. First report of new races of barley yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) in Iran. Journal of Plant Pathology 99(3):799-818.
- Sandoval IJS, Osada KS, Vivar FH y Benítez RI. 1999. Correlación entre resistencia en plántula y resistencia en planta adulta a la roya amarilla y a la escaldadura de la cebada. Agrociencia 33(4):415-422.
- Sandoval IJS, Broers LHM, Mora AG, Parlevliet JE, Osada KS and Vivar HE. 2007. Quantitative resistance and its components in 16 barley cultivars to yellow rust, *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*. Euphytica 153:295-308.

- Statistical Analysis System (SAS). 2016. Release 9.3 for Windows. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <http://www.gob.mx/siap>, junio 2022.
- Stubbs RW. 1985. Stripe Rust. *In*: The Cereal Rust Vol. II Diseases, Distribution, Epidemiology, and control. Roelfs AP and Bushnell WR (eds.). Academic Press, Inc. (London) LTD. 61-91 pp.
- Wang M and Chen X. 2012. Virulence, frequency, and distribution of races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and *P. striiformis* f. sp. *hordei* identified in the United States in 2008 and 2009. *Plant Disease* 96(1):67-74. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0119>
- Wang M and Chen X. 2019. Stripe rust epidemics of wheat and barley and races of *Puccinia striiformis* identified in the United States in 2018. (Abstr.) *Phytopathology* 109:S2.84. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-109-10-S2.1>
- Xi K, Chen XM, Capettini F, Falconi E, Yang RC, Helm JH, Holtz MD, Juskiw P, Kumar K, Nyachiro J and Turkington TK. 2013. Multivariate analysis of stripe rust assessment and reactions of barley in multi-location nurseries. *Canadian Journal of Plant Science* 93(2): 209-219. <https://doi.org/10.4141/CJPS2012-051>
- Zadoks JC, Chang TT and Konzak CF. 1974. A Decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14(6):415-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zamora DM, Márquez CLA, Ramirez PF e Ibañez CAM. 1997. ESMERALDA Variedad de cebada maltera para los Valles Altos. Campo Experimental Valle de México, INIFAP. Folleto Técnico No. 5. Chapingo, Edo. de Méx., México. 20 p.

Climate, fruiting and frosty pod rot influence the epidemic intensity of *Phytophthora capsici* in cacao plantations in Mexico

Clima, fructificación y moniliasis determinan la intensidad epidémica de *Phytophthora capsici* en cacao en México

Magdiel Torres-de la Cruz, ¹División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Km. 0.5 Carretera Villahermosa-Cárdenas, CP 86150, Villahermosa, Tabasco, México; **Gustavo Mora-Aguilera**, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, CP. 56230. Estado de México, México; **Carlos F. Ortiz-García***, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, H. Cárdenas, Tabasco, CP 86500, México; **José Á. Gaspar-Génico¹**, **Manuel Pérez-de la Cruz¹**, **Nitzarindany Acencio-Castillo¹**.

*Corresponding author: cfortizg@gmail.com

Received: September 22, 2022.

Accepted: December 10, 2022.

Torres-de la Cruz M, Mora-Aguilera G, Ortiz-García CF, Gaspar-Génico JA, Pérez-de la Cruz M and Acencio-Castillo N. 2023. Climate, fruiting and frosty pod rot influence the epidemic intensity of *Phytophthora capsici* in cocoa plantations in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 26-44.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-3>

First DOI publication: December 30, 2022.

Primera publicación DOI: 30 de Diciembre, 2022.

Abstract. In Mexico, *Theobroma cacao* is affected by the black pod rot (BPR) caused by *Phytophthora capsici*. Currently, an epidemiological study of this disease is lacking. The objective was to determine the influence of climate, fruit set and the incidence of cacao frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) on the epidemic intensity of BPR in five locations in

Resumen. En México, *Theobroma cacao* es afectado por la mancha negra (MN) causada por *Phytophthora capsici*. Actualmente se carece de un estudio epidemiológico de esta enfermedad. El objetivo fue conocer la influencia del clima, fructificación y la incidencia de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en la intensidad epidémica de MN en cinco localidades del sureste de México. Se analizó la estructura temporal epidémica de MN y se estudió la correlación de cambios absolutos de incidencia MN con temperatura, humedad relativa (HR), precipitación, y flujos de fructificación. La posible competencia entre *P. capsici* y *M. roreri* también se analizó correlativamente. Las epidemias tuvieron una duración de 15 a 25 semanas restringidas a septiembre – febrero con incidencias finales (Y_p) del 6 al 24%. Las curvas se ajustaron al modelo Gompertz ($r = 0.059 - 0.123$, $R^2 0.97 - 0.99$) con fase exponencial en octubre correspondiendo con

southeastern Mexico. The temporal structure of BPR epidemics was analyzed and the correlation of absolute change of BPR incidence with temperature, relative humidity (RH), precipitation, and fruiting flows was studied. The possible competition between *P. capsici* and *M. royeri* was also analyzed correlatively. The epidemics had a duration of 15 to 25 weeks restricted to September - February with 6 to 24% final incidence (Y_f). The curves were best fitted to the Gompertz model ($r = 0.059 - 0.123$, $R^2 0.97 - 0.99$) with an exponential phase in October corresponding with the highest rainfall. BPR was positively associated with RH greater than 90%, precipitation, temperature periods lower than 19.9, and 20 - 26.9 °C, and with fruiting intensity. *P. capsici* had less parasitic fitness than *M. royeri*, which induced earlier epidemics, with greater duration and intensity. The characterization of BPR as a polycyclic epidemic justifies management strategies aimed at reducing the secondary inoculum.

Key words: Black pod rot, *Theobroma cacao*, Cacao frosty pod rot, Gompertz.

Cacao (*Theobroma cacao*) is an important crop in the agriculture of southeastern Mexico. Currently, 52,994 ha are cultivated, where Tabasco and Chiapas concentrate the highest production in the country (SIAP, 2022). This crop is affected by several elements, such as environmental, economic, and social, and the presence of pests and diseases (Hernández-Gómez *et al.*, 2015). One of the important diseases in this country is frosty pod rot (FPR), caused by the fungus *Moniliophthora royeri*, which causes losses of up to 75% of production (Torres-de la Cruz *et al.*, 2020). It is followed in importance by the black pod rot (BPR) of the cacao, caused by the oomycete *Phytophthora capsici* (Hernández-Gómez *et al.*, 2015; Ortíz-

la mayor precipitación pluvial. La MN se asoció positivamente con HR mayor al 90%, precipitación, periodos de temperaturas menores de 19.9 y de 20 - 26.9 °C, y con intensidad de fructificación. *P. capsici* tuvo menor aptitud parasítica que *M. royeri*, el cual indujo epidemias más tempranas, con mayor duración e intensidad. La caracterización de MN como epidemia policíclica justifica estrategias de manejo dirigidas a la reducción del inóculo secundario.

Palabras clave: Mancha negra, *Theobroma cacao*, Moniliasis, Gompertz.

El cacao (*Theobroma cacao*) es un cultivo importante en la agricultura del sureste de México. Actualmente se cultivan 52,994 ha, donde Tabasco y Chiapas concentran la mayor producción del país (SIAP, 2022). Este cultivo es afectado por diversos factores, tanto ambientales, económicos y sociales, a los cuales se suma la presencia de plagas y enfermedades (Hernández-Gómez *et al.*, 2016). En este país, una de las enfermedades importantes es la moniliasis, causada por el hongo *Moniliophthora royeri*, la cual causa pérdidas de hasta 75% de la producción (Torres-de la Cruz *et al.*, 2020). Le sigue en importancia la mancha negra del fruto del cacao (MN), causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* (Hernández-Gómez *et al.*, 2016; Ortíz-García, 1996), con pérdidas productivas entre 20 y 25% (Bowers *et al.*, 2001).

La MN se reportó por primera vez en el Caribe en 1727 en la isla de Trinidad (Tollenaar, 1959). En la actualidad se tienen registros de esta enfermedad en África, Asia, Oceanía y América (Sánchez-Cuevas *et al.*, 2015). Hasta 1979, *P. palmivora* fue considerado el agente causal de la MN (Akrofi, 2015). Actualmente, a nivel mundial se ha documentado más de siete especies del género *Phytophthora* como agentes causales de la MN. En cada país

García, 1996), with productive losses between 20 and 25% (Bowers *et al.*, 2001).

BPR was first reported in the Caribbean in 1727 on the island of Trinidad (Tollenaar, 1959). Currently, there are records of this disease in Africa, Asia, Oceania, and America (Sánchez-Cuevas *et al.*, 2015). Until 1979, *P. palmivora* was considered the causative agent of BPR (Akrofi, 2015). Currently, more than seven species of the genus *Phytophthora* have been documented worldwide as causative agents of BPR. In each country where *T. cacao* is cultivated, several prevalent species induce contrasting damage. The main causal species of BPR are *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora*, *P. megasperma*, *P. arecae*, *P. heveae*, and *P. capsici* (Kroon *et al.*, 2012). In the American continent, mainly *P. palmivora*, *P. parasitica*, and *P. capsici* have been reported (Ortiz-García, 1996; Bahía *et al.*, 2015), and more recently *P. tropicalis* (Aragaki and Uchida, 2001) and *P. cacaicola* (Decloquement *et al.*, 2021). In Mexico, *P. palmivora* was initially identified as the causal agent; however, Ortiz-García (1996) demonstrated that *P. capsici* is the only causal agent of BPR in Tabasco and northern Chiapas. The involvement of *P. capsici* in BPR in Chiapas was recently confirmed (Hernández-Gómez *et al.*, 2015).

BPR is characterized by producing necrotic lesions on the fruits (pods and grains) and leaf tissue (Sánchez-Cuevas *et al.*, 2015). Although fruit damage is more frequent, unlike *M. royeri*, it can cause stem canker and cause tree death (Marelli *et al.*, 2019). All ages of fruits are susceptible to BPR and the infection appears in the form of circular spots with a regular edge, dark brown in color, which spread evenly over the surface until they completely cover the ear (Acrofi, 2015). The infected fruits turn black, become mummified, and can remain on the tree for several months (Ndoumbe Nkeng *et al.*, 2017). The symptoms

donde se cultiva *T. cacao* existen diversas especies prevalentes induciendo daños contrastantes. Las principales especies causales de MN son *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora*, *P. megasperma*, *P. arecae*, *P. heveae* y *P. capsici* (Kroon *et al.*, 2012). En el continente americano se ha reportado principalmente a *P. palmivora*, *P. parasitica* y *P. capsici* (Ortiz-García, 1991; Bahía *et al.*, 2015), y más recientemente *P. tropicalis* (Aragaky y Uchida, 2021) y *P. cacaicola* (Decloquement *et al.*, 2021). En México, inicialmente se señaló a *P. palmivora* como el agente causal; sin embargo, Ortiz-García (1996) demostró que *P. capsici* es el único agente causal de la MN en Tabasco y Norte de Chiapas. Recientemente se confirmó la implicación de *P. capsici* en la MN en Chiapas (Hernández-Gómez *et al.*, 2016).

La MN se caracteriza por producir lesiones necróticas en los frutos (mazorcas y granos) y tejido foliar (Sánchez-Cuevas *et al.*, 2015). Aunque el daño en fruto es más frecuente, a diferencia de *Moniliophthora royeri*, puede causar cancro del tallo y provocar la muerte del árbol (Marelli *et al.*, 2019). Los frutos de todas las edades son susceptibles a la MN y la infección aparece en forma de manchas circulares de borde regular, de color café oscuro, las cuales se extienden uniformemente por la superficie hasta cubrir totalmente la mazorca (Acrofi, 2015). Los frutos infectados se tornan color negro, se momifican y pueden permanecer en el árbol por varios meses (Ndoumbe Nkeng *et al.*, 2017). Los síntomas y la progresión de la MN dependen del genotipo del cacao, la especie de *Phytophthora* involucrada y la influencia de temperatura, humedad relativa y la precipitación (Puig *et al.*, 2018).

En México, los estudios relacionados a la MN son escasos (Hernández-Gómez *et al.*, 2016; Ortiz-García, 1996). En el sureste de México existe la disposición por reactivar la producción de cacao; sin embargo, la MN y la moniliasis del cacao son

and progression of BPR depend on the cacao genotype, the *Phytophthora* species involved, and the influence of temperature, relative humidity, and precipitation (Puig *et al.*, 2018).

In Mexico, studies related to BPR are scarce (Hernández-Gómez *et al.*, 2015; Ortiz-García, 1996). In the southeast of Mexico, there is a willingness to reactivate cocoa production; however, BPR and FPR are strongly limiting endemic parasites, so epidemiological information is required to develop effective and relevant regional mitigation strategies. Therefore, the objective of this research was to determine the influence of climatic factors, fruiting flows, and the incidence of FPR on the epidemic intensity of BPR in five plantations in southeastern Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Study area. This work was carried out in five cacao plantations in the state of Tabasco and the northern region of Chiapas, Mexico. The data was recorded in the 2011-2012 production cycle. The study area is in a hot humid climate with abundant rainfall in summer. The average annual precipitation is 2432 mm, with rainy periods that extend from June to March, and a dry period in April and May. The average annual temperature is 26 °C and Vertisol and Gleysol soils predominate (INEGI, 2017). Data on the geographic location and altitude of each plantation are indicated in Table 1.

Characteristics of the plantations. The study was carried out in traditional commercial cacao plantations, made up of trinitarian-type hybrids, susceptible to BPR. The plantations were 20 to 25 years old and had a density of 784 plants ha⁻¹ with an approximate topological arrangement of 3.5 × 3.5 m. In each plantation, an experimental plot

fuertes limitantes parasíticas endémicas por lo que se requiere información epidemiológica para desarrollar estrategias de mitigación regionales efectivas y pertinentes. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue conocer la influencia de los factores climáticos, los flujos de fructificación y la incidencia de la moniliasis del cacao en la intensidad epidémica de la MN en cinco plantaciones-localidades en el sureste de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. Este trabajo se desarrolló en cinco plantaciones de cacao en el estado de Tabasco y región Norte de Chiapas, México. Los datos fueron registrados en el ciclo productivo 2011-2012. El área de estudio se encuentra en un clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano. La precipitación media anual es de 2432 mm, con periodos de lluvia que se extienden de junio a marzo, y periodo de sequía en abril y mayo. La temperatura media anual es de 26 °C y predominan los suelos vertisoles y gleysoles (INEGI, 2017). Datos de ubicación geográfica y altitud de cada plantación se indican en el Cuadro 1.

Características de las plantaciones. El estudio se realizó en plantaciones comerciales tradicionales de cacao, constituidas por híbridos de tipo Trinitario, susceptibles a la MN. Las plantaciones tuvieron de 20 a 25 años y una densidad de 784 plantas ha⁻¹ con un arreglo topológico aproximado de 3.5 × 3.5 m. En cada plantación se delimitó una parcela experimental de 180 árboles en un área rectangular de 10 × 18 árboles de cacao. En total se evaluaron 48 árboles en la sección central de 4 × 12. El manejo de las plantaciones consistió en la eliminación mecánica de brotes vegetativos basales y el control mecánico de maleza.

Table 1. The geographical location of experimental cacao plantations for the epidemic study of black pod rot in Tabasco and Northern Chiapas, Mexico.

Cuadro 1. Ubicación geográfica de plantaciones de cacao experimentales para el estudio epidémico de la mancha negra en Tabasco y Norte de Chiapas, México.

| Municipio/ Estado | Plantación | Altitud (msnm) | Latitud N | Longitud O |
|-----------------------|--------------|----------------|---------------|---------------|
| Paraíso, Tabasco | Moctezuma | 3 | 18° 21' 06.9" | 93° 12' 57.8" |
| Cunduacán, Tabasco | La Piedra | 14 | 18° 07' 45.2" | 93° 11' 52.4" |
| Cárdenas, Tabasco | Poblado C-28 | 3 | 18° 01' 46.7" | 93° 29' 42.0" |
| Huimanguillo, Tabasco | Paredón | 7 | 17° 44' 59.6" | 93° 23' 57.8" |
| Pichucalco, Chiapas | Platanar | 76 | 17° 33' 01.3" | 93° 18' 09.9" |

of 180 trees was delimited by a rectangular area of 10 × 18 cocoa trees. A total of 48 trees were evaluated in the 4 × 12 central section. Plantation management consisted of the mechanical removal of basal vegetative shoots and mechanical weed control.

Fruit register. Fruits greater than 7 cm in length, including snappers, green, and ripe fruits, were recorded weekly for one year to determine the fluctuation of the flow of potential fruits to infection by *P. capsici* and to relate the incidence of disease.

Incidence of BPR and FPR of cocoa evaluation.

In each plantation, all the fruits from 8 to 10 cm long were labeled, coming from the flows of flowering, and mooring of fruits that appeared during the evaluation year. The number of fruits was estimated through a census of 48 trees. Each fruit was observed weekly in situ to detect symptoms and signs of BPR, which consisted of dark brown circular spots with a regular border, and a thin layer of mycelium with the appearance of whitish cotton. On the other hand, to evaluate the competitive potential of the infection of the fungus that causes FPR on the incidence of BPR, the number of fruits diseased by FPR, whose symptoms were brown spot (chocolate spot) with irregular edges

Registro de frutos. Frutos mayores a 7 cm de longitud, incluyendo chilillos, frutos verdes y maduros, se registraron de forma semanal durante un año para determinar la fluctuación del flujo de frutos potenciales a la infección por *P. capsici* y para relacionar la incidencia de enfermedad.

Evaluación de incidencia de MN y la moniliasis del cacao.

En cada plantación se etiquetaron todos los frutos de 8 a 10 cm de largo, provenientes de los flujos de floración y amarre de frutos que se presentaron durante el año de evaluación. El número de frutos se estimó mediante censo de 48 árboles. Cada fruto se observó semanalmente *in situ* para detectar síntomas y signos de MN que consistieron en manchas circulares con borde regular color café oscuro, y una capa de micelio poco densa con apariencia de algodón blanquecino. Por otra parte, para evaluar el potencial competitivo de la infección del hongo causante de la moniliasis sobre la incidencia de MN se registró semanalmente el número de frutos enfermos por moniliasis cuyos síntomas fueron mancha color café (mancha chocolate) con bordes irregulares y esporulación abundante de acuerdo con Torres-de la Cruz *et al.* (2020). Para estimar la incidencia de cada enfermedad se registró el número de frutos enfermos entre el número total de frutos evaluados por 100.

and abundant sporulation, was recorded weekly according to Torres-de la Cruz *et al.* (2020). To estimate the incidence of each disease, the number of diseased fruits was recorded among the total number of fruits evaluated per 100.

Temporal analysis of the progress of cocoa black pod rot. The temporal analysis of the BPR was performed according to Torres-de la Cruz *et al.* (2020). For this, graphs of the temporal progress of the incidence percentage, accumulated and not accumulated, were generated as a function of time for each plot. With the accumulated plot progress, the initial incidence (Y_0), area under the disease progress curve (AUDPC), apparent infection rate (r) with the Gompertz model in its non-linear form, and final accumulated incidence (Y_f) were estimated (Torres-de la Cruz *et al.*, 2020; Campbell and Madden, 1990). Additionally, the monomolecular and logistic epidemiological models were adjusted to analyze the possible monocyclic and polycyclic effects of the infection. The incidence values were multiplied by four to scale the epidemic curve and allow adjustment to the epidemiological models since Y_f was less than 10%.

Climatic variables. Temperature and relative humidity were recorded per plantation at 2-h intervals using Hobo H8® sensors (Onset Instruments, Pocasset, MA, USA), installed 2 m above the center of the plot. Data was collected weekly. Accumulated monthly precipitation data for 2011 and 2012 were obtained from records of stations closest to the studied plantations: Poblado C-28 (Station 27078), Paraíso (Station 27034), Tulipán (Station 27051), INIFAP (Station 27095), Platanar (Station 07130).

Statistical analysis. The calculations of the apparent infection rate (r), AUDPC and the adjustment of

Análisis temporal del progreso de la mancha negra del cacao. El análisis temporal de la MN se realizó de acuerdo con Torres-de la Cruz *et al.* (2020). Para ello, por cada parcela se generaron gráficas del progreso temporal del porcentaje de incidencia, acumulada y no acumulada, en función del tiempo. Con el progreso acumulado parcelario se estimó la incidencia inicial (Y_0), área bajo la curva de progreso de enfermedad (ABCPE), tasa de infección aparente (r) con el modelo Gompertz en su forma no lineal, e incidencia acumulada final (Y_f) (Torres-de la Cruz *et al.* 2020; Campbell y Madden, 1990). Adicionalmente, se ajustaron los modelos epidemiológicos monomolecular y logístico para analizar el posible efecto monocíclico y policíclico de la infección. Los valores de incidencia se multiplicaron por cuatro para escalar la curva epidémica y permitir el ajuste a los modelos epidemiológicos ya que Y_f fue inferior al 10%.

Variables climáticas. La temperatura y la humedad relativa se registró por plantación a intervalos de 2 h mediante sensores Hobo H8® (Onset Instruments, Pocasset, MA, EUA), instalados a 2 m de altura al centro de parcela. Los datos se recolectaron semanalmente. Datos de precipitación acumulada mensual de 2011 y 2012 se obtuvieron de registros de estaciones más cercanas a las plantaciones estudiadas: Poblado C-28 (Estación 27078), Paraíso (Estación 27034), Tulipán (Estación 27051), INIFAP (Estación 27095), Platanar (Estación 07130).

Análisis estadístico. Los cálculos de la tasa de infección aparente (r), ABCPE y el ajuste de los datos de incidencia a modelos epidemiológicos se realizaron con procedimientos NLIN, SUMMARY y GLM de SAS® (SAS Institute, 2004). Como criterio de bondad de ajuste se utilizó el coeficiente de determinación. Se realizó la comparación entre plantaciones con cada una de las variables ambientales

the incidence data to epidemiological models were carried out with the NLIN, SUMMARY, and GLM procedures of SAS® (SAS Institute, 2004). The determination coefficient was used as a goodness-of-fit criterion. The comparison between plantations was made with each one of the environmental variables by means of ANOVA ($p = 0.5$). With a weekly lag due to the average incubation period, the absolute incidence of BPR was correlated with the weekly average temperature, weekly average relative humidity, and the number of fruits. Similarly, the absolute incidence was correlated with lagged intervals of temperature and relative humidity for which the number of hours/week of temperature and relative humidity in the following intervals was calculated: temperature, a) < 19.9 °C; b) $20-26.9$ °C; c) $27-29.9$ °C; d) $30-34.9$ °C, and e) > 35 °C; and relative humidity, a) < 59.9 %, b) $60-90$ %, and c) > 90 %. The accumulated monthly incidence was correlated with the accumulated monthly precipitation, without lag, and the correlation between the final incidence of BPR and the accumulated precipitation during the months of epidemic progression (September 2011-February 2012) was analyzed. To assess the potential for competition between the causative agents of FPR and BPR, peaks of FPR with a delay of two to three weeks, during October–January, were correlated with respect to BPR peaks. Correlations were analyzed with Spearman's coefficient (Rho) using IBM SPSS® 22.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Temporal behavior of cacao black pod rot.

Five BPR epidemics were generated, one for each locality plot studied (Figure 1). At the Moctezuma, La Piedra, and Poblado C-28 sites, BPR occurred between 15 and 18 weeks. In Paredón and Platanar,

mediante ANOVA ($p = 0.5$). Con un desfase semanal por efecto del periodo promedio de incubación, la incidencia absoluta de MN se correlacionó con la temperatura promedio semanal, humedad relativa promedio semanal, y con el número de frutos. Análogamente, la incidencia absoluta se correlacionó con intervalos desfasados de temperatura y humedad relativa para lo cual se calculó el número de horas/semana de temperatura y humedad relativa en los siguientes intervalos: temperatura, a) < 19.9 °C; b) $20-26.9$ °C; c) $27-29.9$ °C; d) $30-34.9$ °C, y e) > 35 °C; y humedad relativa, a) < 59.9 %, b) $60-90$ %, y c) > 90 %. La incidencia acumulada mensual se correlacionó con la precipitación acumulada mensual, sin desfase, y se analizó la correlación entre incidencia final de MN con la precipitación acumulada durante los meses de progresión epidémica (septiembre 2011- febrero 2012). Para evaluar la potencial de competencia entre los agentes causales de moniliasis y MN se correlacionaron picos de moniliasis desfasados por dos a tres semanas, durante octubre–enero, respecto a picos de MN. Las correlaciones se analizaron con el coeficiente de Spearman (Rho) mediante el software IBM SPSS® 22.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento temporal de la mancha negra del cacao.

Se generaron cinco epidemias de MN, una por cada localidad-parcela estudiada (Figura 1). En los sitios Moctezuma, La Piedra y Poblado C-28, la MN se presentó de 15 - 18 semanas. En Paredón y Platanar la MN se extendió por 25 semanas. Todas las epidemias en general exhibieron una curva sigmoideal con ligeros eventos inter-sigmoideales. Las epidemias de Moctezuma, Paredón y Platanar tuvieron una prolongada fase pre-exponencial entre el 30 de agosto y 15 de octubre. Epidemias de MN

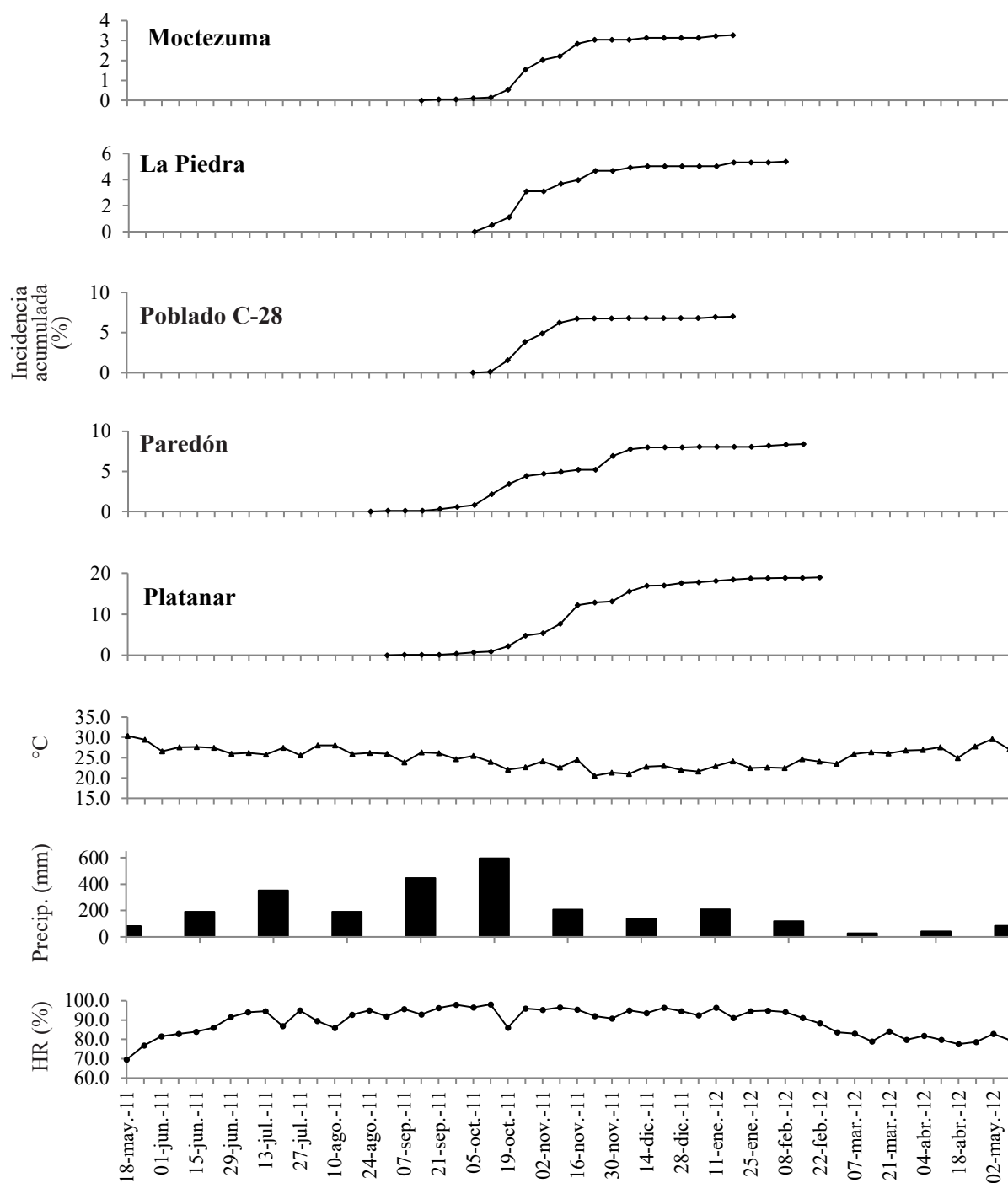


Figure 1. Epidemic curves of the cumulative temporal progress of cacao black pod rot incidence, caused by *Phytophthora capsici*, in five commercial plantations with traditional technology in Tabasco and northern Chiapas, Mexico. Productive cycle 2011-2012.

Figura 1. Curvas epidémicas del progreso temporal acumulado de incidencia de la mancha negra del cacao, causada por *Phytophthora capsici*, en cinco localidades-plantaciones comerciales con tecnología tradicional. Comportamiento promedio de temperatura, humedad relativa y precipitación en las cinco localidades de Tabasco y Norte de Chiapas. Ciclo productivo 2011-2012.

the BPR was extended for 25 weeks. All the epidemics in general exhibited a sigmoidal curve with slight inter-sigmoidal events. The epidemics of Moctezuma, Paredón, and Platanar had a prolonged pre-exponential phase between August 30 and October 15. Atypical sigmoidal conformation BPR epidemics have also been reported for *P. megakarya* in Cameroon (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2017). These atypical, inter-sigmoidal increases may be due to new foci of infection (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2017; Ristaino, 2000). While Torres-de la Cruz *et al.* (2020) attributed them to variations in the fruiting rate with intermittent infection events in the case of *Moniliophthora roreri*.

The final incidence (Y_f), adjusted by the number of fruits produced during the disease period, fluctuated from 6.3 to 24.8% with an average incidence of 12.5% (Table 2). The lowest Y_f occurred in the Moctezuma plantation, while the highest was obtained in Platanar (Table 2). These results represent a low intensity compared to other regions in Africa with the occurrence of *P. megakarya*

de conformación sigmoidal atípicas también se han reportado para *P. megakarya* en Camerún (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2017). Esto incrementos atípicos, inter-sigmoidales pueden deberse a nuevos focos de infección (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2017; Ristaino, 2000). Mientras que Torres-de la Cruz y colaboradores (2020), los atribuyeron a variaciones en el ritmo de fructificación con eventos intermitentes de infección en el caso de *Moniliophthora roreri*.

La incidencia final (Y_f), ajustada por el número de frutos producidos durante el periodo de enfermedad, fluctuó de 6.3 a 24.8% con una incidencia promedio de 12.5% (Cuadro 2). La menor Y_f se presentó en la plantación de Moctezuma, mientras que la mayor se obtuvo en Platanar (Cuadro 2). Estos resultados representan una intensidad baja respecto a otras regiones en África con ocurrencia de *P. megakarya* entre baja y alta incidencia (1.15 al 70%), y baja y moderada (16 al 40%) según la precipitación pluvial anual (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009). La dependencia de la precipitación de *Phytophthora* spp. para altas tasas de infección

Table 2. Epidemiological parameters of the progress of the accumulated incidence of cacao black pod rot (*Phytophthora capsici*) in five plantations in Tabasco and Northern Chiapas, Mexico, and adjustment to an epidemiological model. Productive cycle 2011-2012.

Cuadro 2. Parámetros epidemiológicos del progreso de la incidencia acumulada de la mancha negra del cacao (*Phytophthora capsici*) en cinco plantaciones de Tabasco y Norte de Chiapas, México, y ajuste a un modelo epidemiológico. Ciclo productivo 2011-2012.

| Localidad | ABCPE ^w | r ^x | Y _f ^y | Modelo | R ^{2z} |
|--------------|--------------------|----------------|-----------------------------|----------|-----------------|
| Moctezuma | 141.94 | 0.059 | 6.29 | Gompertz | 0.97 |
| La Piedra | 326.06 | 0.067 | 7.76 | Gompertz | 0.97 |
| Poblado C-28 | 514.73 | 0.123 | 12.77 | Gompertz | 0.99 |
| Paredón | 442.92 | 0.035 | 10.76 | Gompertz | 0.95 |
| Platanar | 2,416.80 | 0.046 | 24.78 | Gompertz | 0.99 |

^wABCPE: Area under the disease progress curve. / ^wABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

^xr: Apparent infection rate of the disease estimated with the Gompertz model. / ^xr: Tasa de infección aparente de la enfermedad estimado con el modelo Gompertz.

^yY_f: Final cumulative incidence. / ^yY_f: Incidencia final acumulada.

^zR²: Coefficient of determination. / ^zR²: Coeficiente de determinación.

between low and high incidence (1.15 to 70%), and low and moderate (16 to 40%) depending on the annual rainfall (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009). The dependence of *Phytophthora* spp. precipitation for high infection rates is well documented. However, the intensity of BPR incidence may also depend on the variety of the cacao plant, sanitary management, *Phytophthora* species involved, and plantation cultural management (Akrofi, 2015; Montes-Belmont and de Los Santos, 1989).

The intensity values of the epidemics, estimated with AUDPC, fluctuated between 141.9 and 2,416.8 (Table 2). The plot with the highest AUDPC was Platanar (2,416.8) and the lowest was obtained in Moctezuma (141.9). However, the high AUDPC of the first did not correspond to the highest infection rate ($r = 0.016$) due to its prolonged epidemic compared to Poblado C-28 ($r = 0.041$) (Table 2)

The epidemic curves in all the evaluated plantations had the best goodness of fit to the Gompertz model (Table 2). According to Campbell and Madden (1990), the Gompertz model describes polycyclic epidemics, with asymmetric sigmoidal progress curves. In a polycyclic epidemic, the causative agent has the capacity to produce several cycles of infection, which allows intermittent epidemic increases. In previous work with *M. roreri*, polycyclic events were also shown to be favored by the permanence of infected fruits on the tree, which provide inoculum for continuous infections if there are favorable environmental conditions for the development of the disease and fruit production flows (Torres-de la Cruz *et al.*, 2020).

The characterization of BPR as a polycyclic epidemic may have implications for the establishment of management strategies aimed at reducing the secondary inoculum that delays or reduces the intensity of the epidemic rate (Torres-de la Cruz *et al.*, 2020; Campbell and Madden, 1990). In this case, the periodic removal of

está bien documentada. Sin embargo, la intensidad de incidencia de MN puede depender también de la variedad de la planta de cacao, manejo sanitario, especie de *Phytophthora* implicada, y el manejo cultural de plantación (Akrofi, 2015; Montes-Belmont y de los Santos, 1989).

Los valores de intensidad de las epidemias, estimados con ABCPE, fluctuaron entre 141.9 y 2,416.8 (Cuadro 2). La parcela con mayor ABCPE fue Platanar (2,416.8) y la menor se obtuvo en Moctezuma (141.9). Sin embargo, la alta ABCPE del primero no correspondió con la mayor tasa de infección ($r = 0.016$) debido a su prolongada epidemia respecto a Poblado C-28 ($r = 0.041$) (Cuadro 2).

Las curvas epidémicas en todas las plantaciones evaluadas tuvieron la mejor bondad de ajuste al modelo Gompertz (Cuadro 2). De acuerdo con Campbell y Madden (1990), el modelo Gompertz describe epidemias policíclicas, con curvas de progreso sigmoidal asimétricas. En una epidemia policíclica, el agente causal tiene la capacidad de producir varios ciclos de infección, el cual permite incrementos epidémicos intermitentes. En un trabajo previo con *Moniliophthora roreri* se demostró también eventos policíclicos favorecidos por la permanencia de frutos infectados en el árbol, los cuales proveen inóculo para infecciones continuas mientras existan condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad y flujos productivos de frutos (Torres-de la Cruz *et al.*, 2020).

La caracterización de MN como epidemia policíclica puede tener implicaciones en el establecimiento de estrategias de manejo dirigidas a la reducción del inóculo secundario que permita retrasar o disminuir la intensidad de la tasa epidémica (Torres-de la Cruz *et al.*, 2020; Campbell y Madden, 1990). En este caso, la remoción periódica de frutos enfermos puede tener un impacto

diseased fruits can have a negative impact on the incidence of BPR. In BPR epidemics caused by *P. megakarya*, it has been reported that the removal of diseased fruits can reduce the incidence by up to 30% (Ndoumbe-Nkeng, 2004). The frequency of removal of inoculum sources is decisive. Weekly removals were more effective than biweekly, with a reduction of up to 66% in incidence (Soberanis *et al.*, 1999). Through numerical simulations, it was found that the optimal removal interval was 4 d (Nembot *et al.*, 2017). Additionally, the application of effective fungicides can contribute to the reduction of the primary and secondary inoculum. For example, copper sulfate and Bordeaux broth have been widely used in Mexico for the control of BPR (Torres-de la Cruz *et al.*, 2019).

Fruit production and absolute change in BPR and FPR incidence. Fruit density, from 7 cm to ripe fruits, showed a similar temporal fluctuation in all evaluated plantations. The presence of fruits of different ages, although quantitatively variable, was maintained throughout the evaluation year. The highest production of total fruits was concentrated in the months of August to December (28 fruits tree⁻¹) with a productive peak in October - November (Figure 2), a period that coincided with the exponential epidemic phase in all locations-plantations (Figure 1). Statistically, the positive correlation of absolute incidence with the intensity of fruiting, with a lag of one week ($Rho = 0.52 - 0.74$), was demonstrated (Table 3). This dependence on specific host tissue availability had already been reported in Brazil for BPR (Medeiros, 1967). Similarly, Torres-de la Cruz *et al.* (2020) also reported a close dependence between the incidence of FPR with the density of fruits for the conditions of Mexico, which raised the hypothesis of competition between these pathogens. The absolute increase in BPR and FPR exhibited multiple incidence peaks

negativo en la incidencia de MN. En epidemias de MN causadas por *P. megakarya*, se reportó que la remoción de frutos enfermos puede reducir hasta 30% la incidencia (Ndoumbe-Nkeng, 2004). La frecuencia de remoción de fuentes de inóculo es determinante. Remociones semanales fueron más efectivas que quincenales, con reducción de hasta el 66% de incidencia (Soberanis *et al.*, 1999). Mediante simulaciones numéricas se encontró que el intervalo óptimo de remoción fue de 4 d (Nembot *et al.* 2017). Adicionalmente, la aplicación de fungicidas eficaces puede contribuir a la reducción del inóculo primario y secundario. Por ejemplo, el sulfato de cobre y caldo bordelés ha sido ampliamente utilizado en México para el control de MN (Torres-de la Cruz *et al.*, 2019).

Producción de frutos y cambio absoluto de incidencia MN y moniliasis. La densidad de frutos, de 7 cm hasta frutos maduros, mostró una fluctuación temporal similar en todas las plantaciones evaluadas. La presencia de frutos de diferentes edades, aunque cuantitativamente variable, se mantuvo durante todo el año de evaluación. La mayor producción de frutos totales se concentró en los meses de agosto a diciembre (28 frutos árbol⁻¹) con un pico productivo en octubre - noviembre (Figura 2), periodo que coincidió con la fase epidémica exponencial en todas las localidades-plantaciones (Figura 1). Estadísticamente, se demostró la correlación positiva de la incidencia absoluta con la intensidad de fructificación con un desfase de una semana ($Rho = 0.52 - 0.74$) (Cuadro 3). Esta dependencia de disponibilidad específica de tejido del hospedante ya se había reportado en Brasil para MN (Medeiros, 1967). Análogamente, Torres-de la Cruz y colaboradores (2020) también reportaron estrecha dependencia entre la incidencia de moniliasis del cacao con la densidad de frutos para las condiciones de México, lo cual planteó la hipótesis de competencia entre estos patógenos.

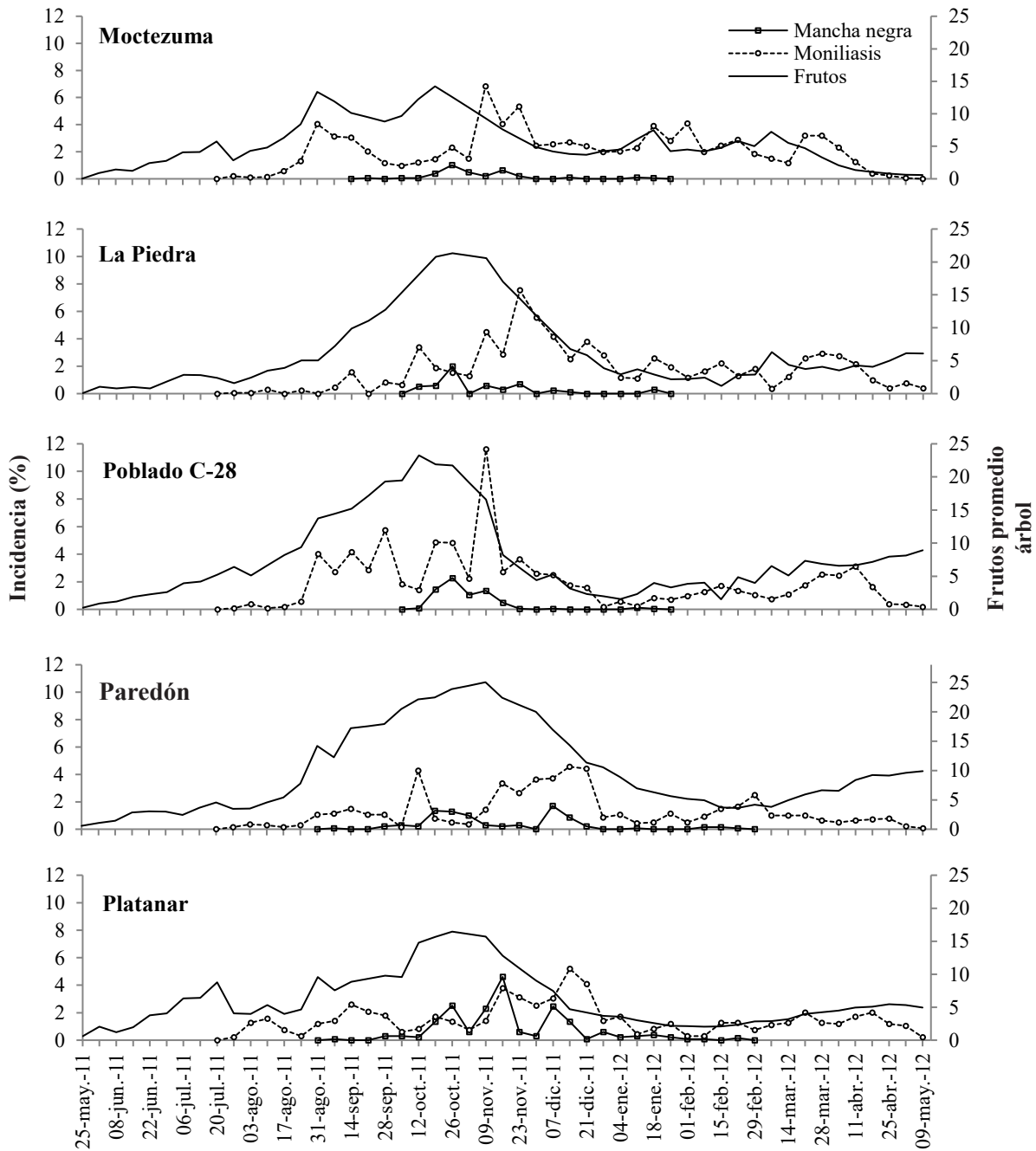


Figure 2. Fluctuation of cacao fruits (greater than 7 cm - ripe fruits) and absolute incidence of cacao black pod rot (*Phytophthora capsici*) and cacao frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*), in five traditional commercial plantations in Tabasco and northern Chiapas, Mexico. Productive cycle May 2011-May 2012.

Figura 2. Fluctuación de frutos de cacao (mayores de 7 cm - frutos maduros) e incidencia absoluta de mancha negra del cacao (*Phytophthora capsici*) y moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*), en cinco plantaciones comerciales tradicionales de Tabasco y Norte de Chiapas, México. Ciclo productivo mayo 2011-mayo 2012.

Table 3. Spearman correlation coefficients (Rho) of absolute incidence of cacao black pod rot with weekly average temperature and relative humidity, lagged one week before the onset of the disease, with accumulated monthly precipitation without lag, and with frosty pod rot of the cacao with a two and three weeks lag, in five localities-commercial cacao plantations in Tabasco and Northern Chiapas. Productive cycle 2011-2012.

Cuadro 3. Coeficientes de correlación de Spearman (Rho) de incidencia absoluta de mancha negra del cacao con temperatura y humedad relativa promedio semanal, desfasados una semana antes de la aparición de la enfermedad, con precipitación acumulada mensual sin desfase, y con la moniliasis del cacao con desfase de dos o tres semanas, en cinco localidades-plantaciones comerciales de cacao en Tabasco y Norte de Chiapas. Ciclo productivo 2011-2012.

| Localidad, Estado | Correlación de Spearman (Rho) | | | Frutos | Moniliasis ^x |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------|-------------------------|
| | Temperatura promedio semanal | Humedad relativa promedio semanal | Precipitación acumulada mensual | | |
| Moctezuma, Tabasco | -0.66 | 0.48 | 0.47 | 0.74 | -0.60 |
| La Piedra, Tabasco | -0.52 | 0.47 | 0.34 | 0.52 | -0.61 |
| Poblado C-28, Tabasco | -0.72 | 0.51 | 0.54 | 0.66 | -0.48 |
| Paredón, Tabasco | -0.71 | 0.59 | 0.49 | 0.53 | -0.48 |
| Platanar, Chiapas | -0.73 | 0.60 | 0.76 | 0.66 | -0.62 |

^xBold values indicate three weeks lag. / ^xValores en negritas indican desfase de 3 semanas.

with greater intensity and frequency in the latter mentioned (Figure 2). Clearly, FPR preceded BPR causative infection events starting between July-August vs September-October for BPR. Due to the occurrence of fruits throughout the year, the contrasting epidemic behavior between and within each disease is due to the parasitic capacity of the pathogens in relation to the local environment. Variable peaks of *P. megakarya* infection due to rainfall intensity were reported in Ghana (Dakwa, 1973), with main peaks in August and October (Opoku *et al.*, 2007; Opoku *et al.*, 2000). While, in Cameroon, with the same pathogen, epidemics were reported that lasted up to 23 weeks, also depending on the intensity of rain (Ndoumbenkeng *et al.*, 2017). In Bahia, Brazil, the highest incidence of BPR (*P. citrophthora*, *P. palmivora*, and *P. capsici*) occurred in the coldest months of the year (June - August) (Oliveira and Luz, 2005), with a maximum peak of incidence three to five months after the start of the epidemic (Medeiros *et al.*, 1969), indicative of more intense epidemics than in this study. The epidemic with the shortest duration occurred in Moctezuma (8 weeks), the

El incremento absoluto de MN y moniliasis exhibieron múltiples picos de incidencia con mayor intensidad y frecuencia en este último (Figura 2). Claramente, la moniliasis precedió eventos de infección causales de MN iniciando entre julio - agosto vs septiembre - octubre para MN. Debido a la ocurrencia de frutos durante todo el año, el comportamiento epidémico contrastante entre y dentro de cada enfermedad se debe a la capacidad parasítica de los patógenos en relación con el ambiente local. En Ghana se reportaron picos de infección de *P. megakarya* variables debido a la intensidad de precipitación (Dakwa, 1973), con principales picos en agosto y octubre (Opoku *et al.*, 2007; Opoku *et al.*, 2000). Mientras que, en Camerún, con mismo patógeno, se reportaron epidemias que se prolongaron hasta por 23 semanas también en función a la intensidad de lluvia (Ndoumbenkeng *et al.*, 2017). En Bahía, Brasil, la mayor incidencia de MN (*P. citrophthora*, *P. palmivora* y *P. capsici*) se presentó en los meses más fríos del año (junio - agosto) (Oliveira y Luz, 2005), con un pico máximo de incidencia en tres a cinco meses posteriores del inicio de epidemia (Medeiros *et al.*,

location with the lowest annual rainfall (1767 mm year⁻¹), while Platanar had the longest (22 weeks), coinciding with the highest rainfall (2992 mm year⁻¹) (Figure 1). However, the epidemic intensity of BPR was lower, both in the intensity of peaks and their frequency compared to frosty pod rot, which demonstrates the greater parasitic aptitude of *M. royeri* for the conditions of southeastern Mexico. This was evidenced by the significant negative correlation between the absolute changes of these two diseases ($Rho = -0.48 - -0.61$) (Figure 2, Table 3). *M. royeri* is a superior fungus that could have evolved with greater infectious and environmental plasticity, conferring greater competitive aptitude on *P. capsici*, at least at the fruit level, restricting the incidence of BPR to levels below 24%, especially when the FPR reaches its necrotrophic stage, generating an enzymatic and tissue environment unsuitable for oomycete infection.

Correlative analysis between climatic factors and BPR. The temperature and relative humidity showed similar behavior in all the plantations, without significant differences between sites ($p>0.05$). However, in Platanar and Paredón, the temperature had the lowest weekly averages (25 and 24.6 °C, respectively) than the rest of the plots. On the other hand, relative humidity had the greatest inter-plot variation. However, no significant differences were found between sites ($p>0.05$). By averaging the temperature and relative humidity of all the sampled sites, at weekly intervals, two periods of temperatures greater than 25 °C were evidenced. The first period was presented from May 25 to October 12 (2011). The second period was recorded from March 14 to May 9 (2012). The longest period of relative humidity above 90% occurred from July to January (Figure 1).

The accumulated monthly precipitation also exhibited a similar pattern in all the sites without significant differences ($p>0.05$). October had the

1969), indicativo de epidemias más intensas que en este estudio. La epidemia con menor duración se presentó en Moctezuma (8 semanas), localidad con la menor precipitación anual (1767 mm año⁻¹), mientras que Platanar tuvo la mayor (22 semanas), coincidiendo con la mayor precipitación (2992 mm año⁻¹) (Figura 1). Sin embargo, la intensidad epidémica de MN fue inferior, tanto en intensidad de picos como su frecuencia respecto a la moniliasis, lo cual demuestra la mayor aptitud parasítica de *M. royeri* para las condiciones del sureste de México. Formalmente, esto se evidenció con la correlación negativa significativa entre los cambios absolutos de estas dos enfermedades ($Rho = -0.48 - -0.61$) (Figura 2, Cuadro 3). *M. royeri*, es un hongo superior que pudo haber evolucionado con mayor plasticidad infecciosa y ambiental confiriendo mayor aptitud competitiva sobre *P. capsici*, al menos a nivel de frutos, restringiendo la incidencia de MN a niveles inferiores al 24%, sobre todo cuando la moniliasis alcanza su etapa necrotrofica generando un entorno enzimático y tisular poco apto para la infección del oomiceto.

Análisis correlativo entre factores climáticos y MN. La temperatura y la humedad relativa mostraron un comportamiento similar en todas las plantaciones, sin diferencias significativas entre sitios ($p>0.05$). Sin embargo, en Platanar y Paredón, la temperatura tuvo los promedios semanales más bajos (25 y 24.6 °C, respectivamente) que el resto de las parcelas. Por otro lado, la humedad relativa tuvo la mayor variación interparcelaria. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre sitios ($p>0.05$). Al promediar temperatura y humedad relativa de todos los sitios muestreados, a intervalos semanales, se evidenció dos periodos de temperaturas mayores a 25 °C. El primer periodo se presentó del 25 de mayo al 12 de octubre (2011). El segundo periodo se registró del 14 de marzo al 9 de mayo (2012). El mayor periodo prolongado de

highest accumulated monthly precipitation (595 mm) with a regional average of 2596 mm yr⁻¹. Total annual precipitation fluctuated from 1767 to 3076 mm yr⁻¹, being less in Moctezuma, near the coast of the Gulf of Mexico, and greater in Platanar (Figure 1).

The incidence of BPR was positively correlated with moderate values with temperature periods lower than 19.9 °C (Rho =0.43 - 0.63) and with temperature periods in the range of 20 - 26.9 °C (Rho = 0.38 - 0.81) (Table 4). Temperatures in the range of 27 to 29.9 °C showed a negative correlation (Rho= -0.53 – -0.80) (Table 4). Two sporangia germination mechanisms of *P. palmivora* have been demonstrated due to the temperature. Direct germination with temperatures close to 25 °C, rupture of the sporangium, release, and germination of zoospores at 15 - 20 °C (Erwin and Ribeiro, 1996). *P. capcisi*, it is possible that the predominant free humidity in October, associated with the increase in rainfall, and with temperatures close to 25 °C activate the direct germination of sporangia constituting the primary inoculum, while temperatures below this threshold, in humid conditions it can be responsible for the rupture of sporangia to produce secondary inoculum.

humedad relativa superior 90% se presentó de julio a enero (Figura 1).

La precipitación acumulada mensual también exhibió un patrón similar en todos los sitios sin diferencias significativas ($p>0.05$). Octubre tuvo la mayor precipitación acumulada mensual (452-780 mm) con un promedio regional de 2596 mm año⁻¹. La precipitación total anual fluctuó de 1767 a 3076 mm año⁻¹, siendo menor en Moctezuma, próximo a la costa del Golfo de México, y mayor en Platanar (Figura 1).

La incidencia de MN se correlacionó positivamente con valores moderados con periodos de temperatura menores a 19.9 °C (Rho =0.43 – 0.63) y con periodos de temperatura en el rango de 20 – 26.9 °C (Rho = 0.38 – 0.81) (Cuadro 4). Temperaturas en el rango 27 a 29.9 °C mostraron una correlación negativa (Rho= -0.53 – -0.80) (Cuadro 4). Se han demostrado dos mecanismos de germinación de esporangios de *P. palmivora* en función de temperatura. Germinación directa con temperaturas cercanas a 25 °C, y ruptura del esporangio, liberación y germinación de zoosporas a 15 - 20°C (Erwin y Ribeiro, 1996). *P. capcisi*, es posible que la humedad libre predominante en octubre, asociada al incremento de precipitación pluvial, y con

Table 4. Spearman correlation coefficients (Rho) of the absolute incidence of cacao black pod rot with intervals of temperature and relative humidity, lagged 8 d before the onset of the disease, in five commercial cocoa plots in Tabasco and North of Chiapas. Productive cycle 2011-2012.

Cuadro 4. Coeficientes de correlación de Spearman (Rho) de la incidencia absoluta de mancha negra del cacao con intervalos de temperatura y humedad relativa, desfasados 8 d antes de la aparición de la enfermedad, en cinco parcelas comerciales de cacao en Tabasco y Norte de Chiapas. Ciclo productivo 2011-2012.

| Localidad, Estado | Correlación de Spearman (Rho) | | | | |
|-----------------------|-------------------------------|------------|------------|----------------------|-------|
| | Intervalo de temperatura | | | Intervalo de humedad | |
| | <19.9 °C | 20-26.9 °C | 27-29.9 °C | 60-90 % | >90 % |
| Moctezuma, Tabasco | 0.43 | 0.81 | -0.80 | -0.45 | 0.77 |
| La Piedra, Tabasco | 0.59 | 0.38 | -0.57 | -0.40 | 0.41 |
| Poblado C-28, Tabasco | 0.41 | 0.65 | -0.67 | -0.57 | 0.57 |
| Paredón, Tabasco | 0.63 | 0.41 | -0.53 | -0.42 | 0.47 |
| Platanar, Chiapas | 0.57 | 0.45 | -0.57 | -0.45 | 0.54 |

In this work, although the relative humidity, in general ($Rho = 0.47 - 0.60$) and the higher humidity 90% was moderately correlated with the incidence ($Rho = 0.41 - 0.77$) (Table 3 and 4), in agreement with other works (Akrofi 2015; Deberdt *et al.*, 2008; Oliveira and Luz, 2005; Dakwa, 1973), this factor may actually be an estimator of saturation moisture on plant tissues, which is determinant for the motor function of flagellate zoospores. Consequently, as expected, the accumulated monthly precipitation and the precipitation associated with the period with BPR incidence (September 2011–February 2012) had a moderate correlation with absolute changes in disease ($Rho = 0.34 - 0.76$, and $Rho = 0.68$, respectively) (Table 3 and 4). In Africa, *P. megakarya* caused 70.3% BPR incidence in sites with rainfall greater than 2200 mm, and 1.15% in those with less than 800 mm (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009).

In all plantations, BPR had its exponential epidemic phase in October, coinciding with the highest monthly precipitation (452-780 mm) (Figure 1), and with the first period of average temperature above 25 °C. However, the longer duration of the epidemic process in Platanar, associated with the highest rainfall (2992 mm year⁻¹), suggests that the temperature is less restrictive for the infection. The free, superficial humidity on the tissues, more than the relative humidity, is determinant for the infection of the fungus, which is congruent with its reproductive physiology and dissemination. This coincides with several works that associate precipitation with the occurrence of the disease (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009; Dakwa, 1973; Medeiros, 1967).

The correlative effects of absolute BPR incidence with temperature and humidity were significant with a weekly lag between climatic induction and symptom onset. This statistical association suggests the existence of an average incubation

temperaturas próximas a los 25 °C active la germinación directa de esporangios constituyendo el inóculo primario, mientras que temperaturas por debajo de este umbral, en condiciones de humedad puede ser responsable de la ruptura de esporangios para la producción de inóculo secundario

En este trabajo, si bien la humedad relativa en general ($Rho = 0.47 - 0.60$) y la superior a 90% se correlacionó moderadamente con la incidencia ($Rho = 0.41 - 0.77$) (Cuadro 3 y 4), en concordancia con otros trabajos (Akrofi 2015; Deberdt *et al.*, 2008; Oliveira y Luz, 2005; Dakwa, 1973), este factor puede ser en realidad un estimador de humedad de saturación sobre tejidos vegetales, la cual es determinante para la función motriz de las zoosporas flageladas. En consecuencia, como era de esperarse, la precipitación acumulada mensual, y la precipitación asociada al periodo con incidencia de MN (septiembre 2011–febrero 2012) tuvo una correlación moderada con cambios absolutos de enfermedad ($Rho = 0.34 - 0.76$, y $Rho = 0.68$, respectivamente) (Cuadro 3 y 4). En África, *P. megakarya* causó 70.3% de incidencia MN en sitios con precipitaciones superiores a 2200 mm, y del 1.15% en aquellos con menos de 800 mm (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009).

En todas las plantaciones, la MN tuvo su fase epidémica exponencial en octubre coincidiendo con la mayor precipitación mensual (452-780 mm) (Figura 1), y con el primer periodo de temperatura promedio superior a 25 °C. Sin embargo, la mayor duración del proceso epidémico en el Platanar, asociado con la más alta precipitación (2992 mm año⁻¹), sugiere que la temperatura es menos restrictiva para la infección. La humedad libre, superficial sobre los tejidos, más que humedad relativa, es determinante para la infección del pseudohongo, lo cual es congruente con su fisiología reproductiva y disseminación. Esto coincide con varios trabajos que asocian la precipitación con la ocurrencia de la

period of one week for *P. capsici* in Trinitario cacao for Mexican conditions. In *P. megakarya*, the BPR incubation period was estimated to be six days in Amelonado cacao trees (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009; Adebayo *et al.*, 1981).

CONCLUSIONS

The analysis of the epidemic structure of black pot rot (BPR) in commercial Trinitario cacao plantations with traditional technology in six locations in southeastern Mexico showed that this disease has a short and low-intensity epidemic process restricted to the September-February period. The Y_f ranged from 6 to 24%, with an average incidence of 12.4%. The highest incidence occurred in Platanar, Pichucalco, Chiapas, and the lowest in Moctezuma, Paraíso, Tabasco. The exponential epidemic phase occurred in October, coinciding with the highest intensity of rainfall (452-780 mm), so this factor could be decisive. All epidemics fit the Gompertz model ($r = 0.059 - 0.123$, $R^2 0.97-0.99$). The primary inoculum was favored by precipitation, relative humidity greater than 90%, and temperatures from 20 to 26.9 °C. Temperatures below 20 °C also contributed to the polycyclic progress of the disease, possibly due to the secondary inoculum produced by indirect germination of sporangia. Despite the availability of susceptible tissue (i.e., fruits) throughout the production process, *P. capsici* had less parasitic aptitude than *M. roreri*, which induced earlier epidemics, with greater duration and intensity. The characterization of BPR as a polycyclic epidemic justifies management strategies aimed at reducing the secondary inoculum to restrict the epidemic rate. Etiological studies are recommended to determine the status of the causative agent(s) of BPR.

enfermedad (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009; Dakwa, 1973; Medeiros, 1967).

Los efectos correlativos de incidencia MN absoluta con temperatura y humedad fueron significativos con un desfase semanal entre la inducción climática y la aparición de síntomas. Esta asociación estadística sugiere la existencia de un periodo de incubación promedio de una semana para *P. capsici* en cacao Trinitario para las condiciones de México. En *P. megakarya*, el periodo de incubación MN se estimó en seis días en árboles de cacao Amelonado (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2009; Adebayo *et al.*, 1981).

CONCLUSIONES

El análisis de la estructura epidémica de la mancha negra (MN) en plantaciones comerciales de cacao Trinitario con tecnología tradicional de cinco localidades del sureste de México demostró que esta enfermedad exhibió un proceso epidémico corto y de baja intensidad restringido al periodo septiembre - febrero. La Y_f estuvo en el rango de 6 a 24%, con incidencia promedio de 12.4%. La mayor incidencia se presentó en Platanar, Pichucalco, Chiapas y la menor en Moctezuma, Paraíso, Tabasco. La fase exponencial epidémica ocurrió en octubre coincidiendo con la mayor intensidad de precipitación pluvial (452-780 mm), por lo que este factor podría ser determinante. Todas las epidemias se ajustaron al modelo Gompertz ($r = 0.059 - 0.123$, $R^2 0.97-0.99$). El inóculo primario fue favorecido por precipitación, humedad relativa mayor al 90%, y temperaturas de 20 a 26.9 °C. Temperaturas menores a 20 °C, también contribuyeron al progreso policíclico de la enfermedad posiblemente por efecto en inóculo secundario producido por germinación indirecta de esporangios. A pesar de

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by the National Council of Science and Technology (CONACYT), project CB-200801-106570. To the orchards owners who strongly supported this work. To the students Isaí Quevedo Damian and Wilbert del C. Arévalo López who contributed with field evaluations.

CITED LITERATURE

- Adebayo AA, Ward MR, Maddison AC and Gregory PH. 1981. The epidemic on sprayed cocoa at Gambari. (Pp. 145-162). In: Gregory PH and Maddison AC. Epidemiology of *Phytophthora* on cocoa in Nigeria; final report of the International Cocoa Black Pod Research Project. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England. 185p.
- Akrofi AY. 2015. *Phytophthora megakarya*: A review on its status as a pathogen on cacao in West Africa. African Crop Science Journal 23:67-87. <https://www.ajol.info/index.php/acsj/article/view/113716>
- Aragaki M and Uchida JY. 2001. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. Mycologia 93:137-145.
- Bahia R, Aguilar C, Luz E, Lopes U, Machado R and Correa R. 2015. Resistance to black pod disease in a segregating cacao tree population. Tropical Plant Pathology 40:13-18. <https://doi.org/10.1007/s40858-014-0003-7>
- Bowers JH, Bailey BA, Hebbard PK, Sanogo S and Lumsden RD. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. Plant Health Progress. <https://doi.org/10.1094/PHP-2001-0709-01-RV>.
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and sons. New York, USA. 560 p.
- Dakwa JT. 1973. The relationship between black pod incidence and the weather in Ghana. Ghana Journal of Agricultural Science 6:93-102. <https://www.degruyter.com/database/IABO/entry/iab19742504/html>
- Deberdt P, Mfegue CV, Tondje PR, Bon MC, Ducamp M and Hurard C. 2008. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. Biological Control 44:149-159. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.026>
- Decloquement J, Ramos-Sobrinho R, Elias SG, Britto DS, Puig AS, Reis A, da Silva RAF, Honorato-Júnior J, Luz EDMN, Pinho DB, Marelli JP. 2021. *Phytophthora theobromicola* sp. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. Frontiers in Microbiology 12:537399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399>.

la disponibilidad de tejido susceptible (i.e., frutos) durante todo el proceso productivo, *P. capsici* tuvo menor aptitud parasítica que *M. roreri*, el cual indujo epidemias más tempranas, con mayor duración e intensidad. La caracterización de MN como epidemia policíclica justifica estrategias de manejo dirigidas a la reducción del inóculo secundario para restringir la tasa epidémica. Se recomiendan estudios etiológicos para determinar el estatus actual del agente causal(es) de la MN.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto CB-200801-106570. A los propietarios de las parcelas comerciales que apoyaron decididamente este trabajo. A los estudiantes Isaí Quevedo Damian y Wilbert del C. Arévalo López quienes contribuyeron con evaluaciones de campo.

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

- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. Phytophthora diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 592 p.
- Hernández-Gómez E, Hernández-Morales J, Avendaño-Arrazate CH, López-Guillen G, Garrido-Ramírez ER, Romero-Nápoles J y Nava-Díaz C. 2015. Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33:232-246. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61242145008.pdf>
- INEGI. 2017. Anuario Estadístico y Geográfico de Tabasco 2017. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. 440 p. [https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2017/702825095123.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825095123.pdf).
- Kroon L, Brouwer H, de Cock A and Govers F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. Phytopathology 102:348-364. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0025>.
- Medeiros AG, Melo JW y Santana JB. 1969. Incidência e disseminação da podridão parda em cacauzeiros na Bahia. In Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Informe Técnico. pp. 68-69.
- Medeiros AG. 1967. Evolução da podridão-parda nos cacauzeiros. In Ilhéus, EPLAC/CEPEC. Informe Técnico. pp. 39-40.



- Marelli JP, Guest DI, Bailey BA, Evans HC, Brown JK, Junaid M, barreto RW, Lisboa DO and puig AS. 2019. Chocolate under threat from old and new cacao diseases. *Phytopathology* 109:1331–1343. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0477-RVW>
- Montes-Belmont R y de los Santos L. 1989. Especies de *Phytophthora* aisladas de cacao en México y su distribución geográfica.
- Ndoumbe-Nkeng M, Cilas C, Nyemb E, Nyasse S, Biéysse D, Flori A and Sache I. 2004. Impact of removing diseased pods on cocoa black pod caused by *Phytophthora megakarya* and on cocoa production in Cameroon. *Crop Protection* 23: 415-424. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.09.010>.
- Ndoumbe-Nkeng M, Efombagn MIB, Nyassé S, Nyemb E, Sache I and Cilas C. 2009. Relationships between cocoa *Phytophthora* pod rot disease and climatic variables in Cameroon. *Canadian Journal of Plant Pathology* 31:309-320. <https://doi.org/10.1080/07060660909507605>
- Ndoumbe-Nkeng M, Efombagn-Mousseni IB, Bidzanga-Nomo L, Sache I and Cilas C. 2017. Spatio-temporal dynamics on a plot scale of cocoa black pod rot caused by *Phytophthora megakarya* in Cameroon. *European Journal of Plant Pathology* 147: 579-590. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1027-2>
- Nembot C, Soh PT, Ambang Z, ten Hoopen GM and Dumont Y. 2017. On the use of mathematical modelling to study the impact of phytosanitation on cocoa black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. In *International Symposium on Cocoa Research (ISCR)*, Lima, Peru (pp. 13-17). <https://agritrop.cirad.fr/588134/>
- Oliveira ML, Luz EDMN. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p.
- Opoku IY, Appiah AA, Akrofi AY and Owusu GK. 2000. *Phytophthora megakarya*: a potential threat to the cocoa industry in Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science* 33:237-248. <https://doi.org/10.4314/gjas.v33i2.1876>
- Opoku IY, Akrofi AY and Appiah AA. 2007. Assessment of sanitation and fungicide application directed at cocoa tree trunks for the control of *Phytophthora* black pod infections in pods growing in the canopy. *European Journal of Plant Pathology* 117: 167-175.
- Ortiz-García CF. 1996. Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogène du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Tesis Doctoral. Université Paul Sabatier-Centre de Physiologie Vegetal – CNRS. Toulouse, Francia. 85 p.
- Puig AS, Ali S, Strem M, Sicher R, Gutierrez OA and Bailey BA. 2018. The differential influence of temperature on *Phytophthora megakarya* and *Phytophthora palmivora* pod lesion expansion, mycelia growth, gene expression, and metabolite profiles. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 102:95–112. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2017.12.002>
- Ristaino JB and Gumpertz ML. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* 38:541-576. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.541>
- Sánchez-Cuevas MC, Jaramillo-Aguilar EE and Ramírez-Morales IE. 2015. Enfermedades del cacao. UTMACH. Ecuador. 152 p.
- SAS Institute. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide Statistics. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA. 5121 p.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. Avances de siembras y cosechas de cultivos perennes por estado en México 2018. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do) (Octubre 2022).
- Soberanis W, Ríos R, Arévalo E, Zuniga L, Cabezas O and Krauss U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. *Crop Protection* 18:677-685. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00073-3)
- Tollenaar D. 1959. *Phytophthora palmivora* del Cacao y su Control. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 22p. <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/16022/BVE21041908e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Torres-de-la-Cruz M, Quevedo-Damián I, Ortiz-García CF, Lagúnez-Espinoza L, Nieto-Angel D and Pérez-de la Cruz M. 2019. Control químico de *Moniliophthora roreri* en México. *Biotecnia* 21:55-61. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i2.906>
- Torres-de la Cruz M, Mora-Aguilera G, Ortiz-García CF, de la Cruz-Pérez A and Gaspar-Génico JA. 2020. Flujos productivos determinan la estructura epidémica de la moniliasis del cacao en el sureste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 43:431-431. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4.431>



# App-ExploraCítricos, a digital development for integrate pest surveillance in citrus crops

## App-ExploraCítricos, un desarrollo digital para la vigilancia integral de plagas cítricas

Gustavo Mora-Aguilera\*, Gerardo Acevedo-Sánchez, Oscar Eder Flores-Colorado, Juan José Coria-Contreras, Eduardo Guzmán-Hernández, <sup>1</sup>Colegio de Posgraduados - Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF). Texcoco, Estado de México. CP 56230; Pedro Robles-García, SENASICA DGSV. Insurgentes Sur No. 489, Col. Hipódromo, C.P. 06100, Ciudad de México.

\* Corresponding author: morag@colpos.mx

Received: September 30, 2022.

Accepted: December 05, 2022.

Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Colorado OE, Coria-Contreras JJ, Guzmán-Hernández E and Robles-García P. 2023. App-ExploraCítricos, a digital development for integrate pest surveillance in citrus crops. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 45-69. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2209-5>

First DOI publication: December 31, 2022.

Primera publicación DOI: 31 de Diciembre, 2022.

**Abstract.** App-ExploraCítricos v2.0 is an application for measuring epidemiological variables with a spatio-temporal, multi-crop, multispecies-variety, multivariate, multi-pest, multiuser, and multicriteria approach for risk analysis in the citrus production chain. The objective of this work was to develop, and field validate an application for mobile devices with Android® 6.0 or higher, which would allow *n*-assessments *in situ* associated with a regional epidemiological process through a flexible

**Resumen.** App-ExploraCítricos v2.0 es una aplicación para medición de variables epidemiológicas con enfoque espacio-temporal, multicultivo, multiespecie-variedad, multivariable, multiplaga, multiusuario y multicriterio para análisis de riesgos en la cadena cítrica. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar en campo una aplicación para dispositivos móviles Android® superior a 6.0, que permitiera realizar *n*-evaluaciones *in situ* asociadas a un proceso epidemiológico regional mediante un diseño flexible personalizado a un objetivo sanitario. El proceso inicia ingresando claves de acceso para autenticación de usuario. Antes de una evaluación el usuario debe configurar las *n*-plagas y/o *n*-enfermedades de interés asociadas al cultivo(s)/especie(s) cítricas incluyendo el nombre común y científico, y tipo de organismo (hongo, virus, bacteria, etc.). La configuración se almacena localmente para posterior aplicación a un proceso evaluativo. Posteriormente se configuran *n*-escalas con *n*-clases independientes, cualitativas o cuantitativas, para evaluar ocurrencia, severidad,

design customized to a sanitary objective. The process begins by entering access codes for user authentication. Before an assessment, the user must configure the *n*-pests and/or *n*-diseases of interest associated with the citrus crop(s)/species(s), including the common and scientific name, and type of organism (fungus, virus, bacterium, etc.). The settings are stored locally for the further assessment process. Subsequently, *n*-scales with *n*-independent, qualitative or quantitative classes are configured to assess occurrence, severity, or infestation per organism. In addition, the presence/absence or vector infestation level can be assessed. Once the assessment criteria have been customized for a regional scenario, sampling begins in *n*-plantations with individual characterization using 26-epidemiological-productive variables, e.g., agronomic condition, age, crop, cultivar, irrigation type, nutrition, management, etc. The assessment is performed in *n*-plants per plantation. Per plant, the *n*-pests and/or *n*-diseases previously configured are assessed with the respective scales. The user may take up to three georeferenced photographs of pest infestation or symptoms for eventual further sampling for etiological purposes. The assessment(s) is virtually submitted to a web database, exported, or shared via email, Bluetooth, social media, or other device tools. The App was successfully validated on citrus crops of San Luis Potosí, Veracruz, and Chiapas states for CTV, CLAs, CiLV, and their respective vectors with a total of 58 plantations and 37700 metadata generated. The App-ExploraCítricos v2.0 is a phytosanitary innovation that may contribute to the integration of large volumes of relevant, standardized, and quality data for risk analysis and management in citrus farming.

**Keywords:** App-Mobil, HLB, CTV, Leprosis, Epidemiology system, Epidemic risk

o infestación por cada organismo. Adicionalmente se puede evaluar presencia/ausencia o nivel de infestación de un vector de patógeno. Una vez personalizado los criterios de evaluación para un entorno regional, se inicia el muestreo en *n*-plantaciones con la caracterización de cada plantación mediante 26-variables epidemiológico-productivas, p.e., condición agronómica, edad, cultivo, cultivar, tipo de riego, nutrición, manejo, etc. La evaluación se realiza en *n*-plantas por plantación. Por planta, se evalúan con las respectivas escalas las *n*-plagas y/o *n*-enfermedades previamente configuradas. Opcionalmente, el usuario puede tomar hasta tres fotografías georreferenciadas de infestaciones o síntomas para posterior toma de muestras con fines etiológicos. Los datos de una evaluación(es) se envía virtualmente a una base de datos web, se exporta o se comparte desde mail, bluetooth, redes sociales u otras herramientas del dispositivo. La App fue exitosamente validada en los estados de San Luis Potosí, Veracruz, y Chiapas para CTV, CLAs, CiLV, y sus respectivos vectores en un total de 58 plantaciones con 37700 metadatos generados. La App-ExploraCítricos v2.0 una innovación fitosanitaria que puede contribuir a la integración de grandes volúmenes de datos pertinentes, estandarizados y de calidad para análisis y gestión de riesgos en la citricultura.

**Palabras clave:** App-móvil, HLB, CTV, Leprosis, sistema epidemiológico, riesgo epidémico.

A partir del ingreso de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), bacteria causal del HLB o Huanglongbing, a regiones cítricas mexicanas en 2009, se fortalecieron estrategias oficiales ante riesgos fitosanitarios de potencial impacto económico. Entre éstos, se concibió el *Plan de Emergencia contra el HLB* para la contención y mitigación nacional

Since *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), the bacterium that causes the HLB or Huanglongbing, was detected in Mexican citrus-growing regions in 2009, government strategies were strengthened in response to phytosanitary risks with potential economic impact. Among these, the *Emergency Plan against HLB* was conceived for the national containment and mitigation of risks associated with the citrus HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a); an *Evaluation of the economic impact of Huanglongbing (HLB) in the Mexican Citrus Production Chain* was conducted for contributing to the definition of phytosanitary policies (Salcedo *et al.*, 2010); a national program to establish *Area Wide Disease Control (ARCOs)*, currently referred to as *Epidemiological Phytosanitary Management Areas (AMEFIs)*, to manage the spread of HLB through the *Diaphorina citri* control, the insect vector of CLas; a *Surveillance System* focused on monitoring at-risk pests not present in Mexico, among other national projects promoted by SENASICA-DGSV. Although these strategies have mitigated productive impacts and generated wide technical diffusion among the productive chain, the need to strengthen a comprehensive model of *prevention*, management, and effective communication of phytosanitary risks still prevails. Epidemic citrus risk scenarios have increased throughout the country from 2009 to the present. Thus, the HLB is present in 387 of the 645 citrus-growing counties in 26 Mexican states (SIAP, 2022); the ‘spread’ and ‘establishment’ of the *Citrus leprosis virus* (CiLV), responsible for Citrus Leprosis, present in 18 states and more than 140 citrus-growing has been recognized; likewise, the re-emergence of *Citrus tristeza virus* with more aggressive variants has been demonstrated in regions of the Mexican Gulf. An outbreak of *Xhantomonas citri*, the causal agent of citrus canker, was detected in the north of the country, which involved monitoring and tree

de riesgos asociados con el HLB de los cítricos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a); se realizó una *Evaluación del impacto económico del Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana* con el fin de coadyuvar a la definición de políticas fitosanitarias (Salcedo *et al.*, 2010); un proyecto nacional para establecer *Áreas Regionales de Control (ARCOs)*, actualmente referidas como *Áreas de Manejo Epidemiológico Fitosanitario (AMEFIs)*, con el fin de manejar la dispersión del HLB mediante control de *Diaphorina citri*, insecto vector de CLas; un *Sistema de Vigilancia* enfocado al monitoreo de plagas de riesgo no presentes en México, entre otros proyectos nacionales impulsados por SENASICA-DGSV. Aunque estas estrategias han mitigado impactos productivos y generado amplia difusión técnica entre actores de la cadena productiva, prevalece la demanda de fortalecer un modelo integral de *prevención*, manejo y comunicación efectiva de riesgos fitosanitarios. De 2009 al presente, los escenarios de riesgos epidémicos cítricos se han incrementado en el territorio nacional. Así, el HLB está presente en 387 de los 645 municipios cítricos de 26 entidades federativas de México (SIAP, 2022); se ha reconocido la ‘dispersión’ y ‘establecimiento’ del *Citrus leprosis virus* (CiLV), responsable de la Leprosis de los cítricos, el cual está presente en 18 estados y más de 140 municipios cítricos; así mismo, se ha demostrado la reemergencia del *Citrus tristeza virus* con variantes más agresivas en regiones del golfo mexicano. En el norte del país se detectó un brote de *Xhantomonas citri*, causal del Cancro de los cítricos, lo cual implicó acciones de monitoreo y eliminación de árboles lográndose erradicación del patógeno. Este evento, y el brote de *Ceratititis capitata* en Colima, constituyen casos mexicanos recientes del éxito de erradicación y demuestran la importancia de programas fitosanitarios preventivos robustos y dinámicos. México, a través del SENASICA, es uno de los países americanos

removal measures and resulted in the eradication of the pathogen. This event, and the outbreaks of *Ceratitis capitata* in Colima, are recent Mexican cases of successful eradication and prove the need for strong and dynamic preventive phytosanitary programs. Through SENASICA, Mexico is amongst the American countries with the highest investment in phytosanitary policies that effect inspection infrastructure, diagnostic, and operation, human resources consolidation, and support programs for the movement and agricultural products trade within the framework of the powers and responsibilities of the Federal Plant Health Law (<https://acortar.link/oLCu0l>). However, scientific research and cutting-edge technological developments in support of official surveillance systems are scarce and oriented toward phytosanitary problems with high risk or social impact (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). In addition, among the different National Plant Protection Organizations (ONPF), there is still a prevailing vision of articulating campaigns aimed at a particular pest, implying independent operation and consequently a strong economic, human and productive inefficiency. However, a gradual adoption of more integrated strategies can be perceived in some production chains. Thus, for example, in citrus, the AMEFIs are aimed at regional epidemiological and phytosanitary management of CTV, CLas, CiLV, their vectors, and secondary pests (e.g., *Aleurocanthus* sp. / citrus blackfly) (<https://acortar.link/oLCu0l>). Implicitly, these new approaches recognize the importance of creating *holistic-systemic* phytosanitary systems for optimizing integrated pest management. This vision is feasible and cannot be postponed due to the current digital revolution and technological availability, which allows processing massive data volumes for automatic and harmonized decision-making on a regional scale (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). Against this background, this work aimed

con mayor inversión en políticas fitosanitarias que impactan en infraestructura de inspección, diagnóstico y operación, consolidación de recursos humanos, y programas de soporte para la movilización y comercialización de productos agrícolas en el marco de las atribuciones y responsabilidades de la Ley Federal de Sanidad Vegetal (<https://acortar.link/oLCu0l>). Sin embargo, proyectos de investigación científica y desarrollos tecnológicos de vanguardia en apoyo a los sistemas oficiales de vigilancia han sido escasos y se han orientado a problemas fitosanitarios de alto riesgo o impacto social (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). Adicionalmente, entre los distintos Organismos Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF) aún prevalece la visión de articular Campañas orientadas a una plaga en particular, lo cual implica operatividad independiente y por consiguiente fuerte ineficiencia económica, humana y productiva. Se percibe, sin embargo, una gradual adopción de estrategias más integrales en algunas cadenas productivas. Así por ejemplo, en cítricos, las AMEFIs tienen como propósito el manejo epidemiológico fitosanitario regional del CTV, CLas, CiLV, sus respectivos vectores, y plagas secundarias (p.e., *Aleurocanthus* sp. / mosca prieta) (<https://acortar.link/oLCu0l>). Estos nuevos enfoques reconocen implícitamente la importancia de generar sistemas fitosanitarios *holístico-sistémicos* que optimicen la gestión integral de plagas. Una visión factible e impostergable en el contexto de la revolución digital actual y la accesibilidad tecnológica, lo cual permite manejar grandes volúmenes de datos para toma de decisiones automáticas y armonizadas a escala regional (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo demostrar el marco conceptual, estructural y operativo de un desarrollo tecnológico digital en plataforma Android como prototipo de un instrumento de vigilancia y gestión integral de plagas de cítricos para oficiales y técnicos

to demonstrate the conceptual, structural, and operational framework of a technological digital development on Android platform as prototype of a tool for surveillance and comprehensive management of citrus pests aimed at ONPF officers and technicians responsible for implementing surveillance - *prevention* - protection coordinated actions against phytosanitary risks. The extrapolation of the conception to any operational and productive environment is also discussed.

## MATERIALS AND METHODS

**Concepción.** The conception of the mobile-app devices for Android® platform was defined as App-ExploraCítricos v2.0. Epidemiological management and decision making were objectives for the conception supporting a conceptual digital model denominated Comprehensive Phytosanitary Citrus System (SIFICIT) for use in official programs. This model is based on the digital management of phytosanitary information provided through multiple users for decision-making in quasi real-time (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). The premise of these objectives was that all information collected with the App should be integrated into an *ad hoc* operating system (Figure 1), which can also integrate historical databases (e.g., weather) from other sources. These computerized surveillance and risk management systems in productive chains such as coffee, agave, and citrus have a conception and structure specific to the phytosanitary needs of each one, and have the *Epidemiological System* as a rational framework, which gives them a *holistic-systemic* vision and focuses on the plant (crop) as the integrating health axis (Mora-Aguilera *et al.*, 2021, Mora-Aguilera *et al.*, 2014b; Guzmán-Hernández *et al.*, 2017).

de ONPF responsables de ejecutar acciones coordinadas de vigilancia - *prevención* - protección ante riesgos fitosanitarios. Se discutirá también la extrapolación de la concepción a cualquier entorno operativo y productivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Concepción.** La concepción de la aplicación para dispositivos móviles con plataforma Android® fue denominada App-ExploraCítricos v2.0. Tuvo como objetivos la gestión epidemiológica y toma de decisiones en soporte a un modelo digital conceptual denominado Sistema Integral Fitosanitario de los Cítricos (SIFICIT) para uso en programas oficiales. Este modelo tiene como base la gestión digital de información fitosanitaria alimentada por múltiples usuarios para toma de decisiones en tiempo *cuasi* real (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). Estos objetivos tuvieron como premisa que toda información obtenida con la App debe integrarse a un sistema operativo *ad hoc* (Figura 1), la cual a su vez puede integrar bases de datos históricas (p.e., clima) de otras fuentes. Estos sistemas computarizados de vigilancia y manejo de riesgos en cadenas productivas como el café, agave y cítricos tienen una concepción y estructura específica a las necesidades fitosanitarias de cada cadena productiva y tienen como marco racional obligado el *Sistema epidemiológico* lo cual les confiere una visión *holística-sistémica* y centra a la planta (cultivo) como el eje integrador de sanidad (Mora-Aguilera *et al.*, 2021, Mora-Aguilera *et al.*, 2014b; Guzmán-Hernández *et al.*, 2017).

**Flujo de proceso en el enfoque de programación.** El flujo implicado en el funcionamiento de App-ExploraCítricos v2.0 se generó con base en actividades directas convencionales de muestreo y



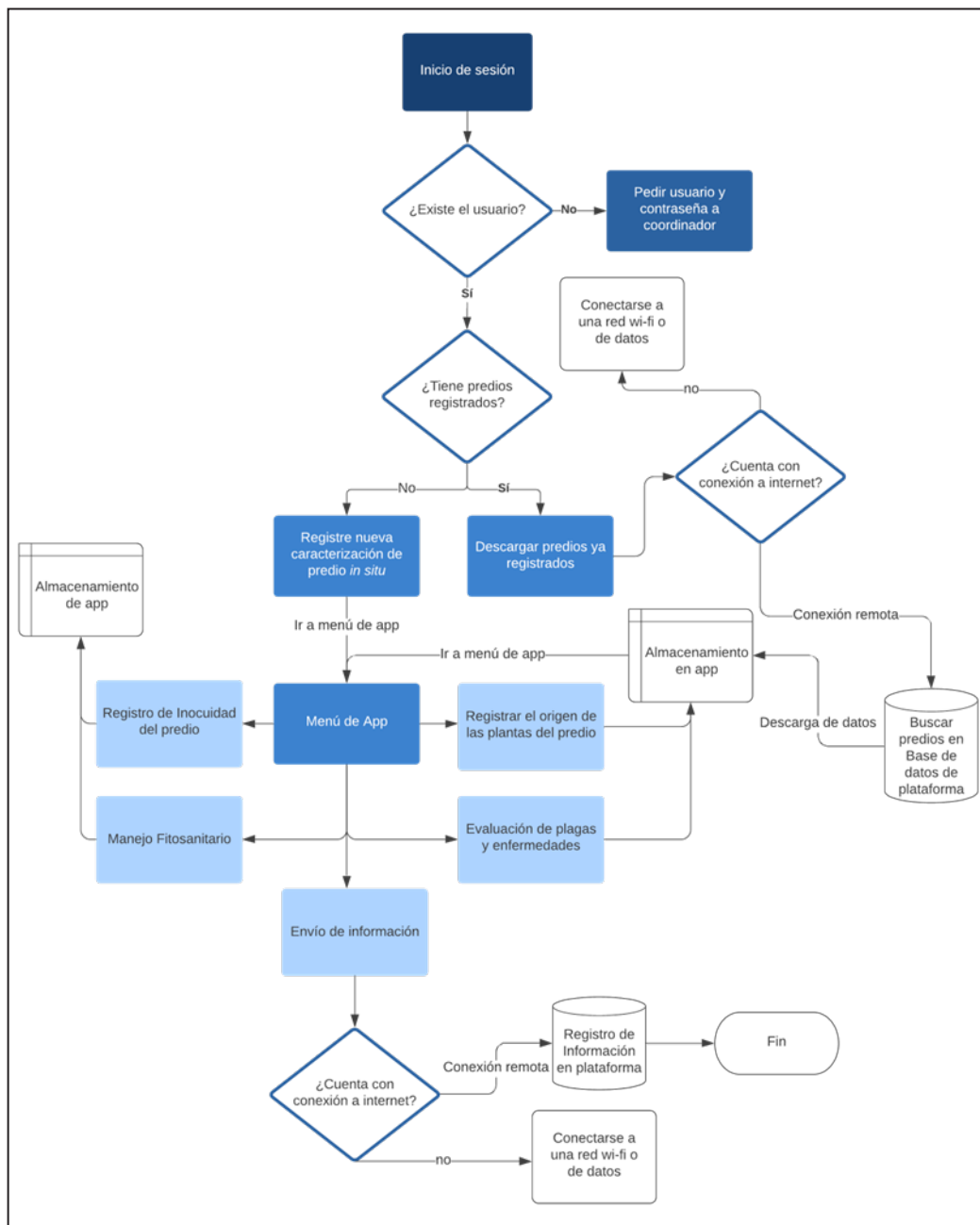


Figure 1. Structural conception flowchart involved during the digital programming of App-ExploraCítricos v2.0 for mobile devices with Android® operating system.

Figura 1. Diagrama de flujo de la concepción estructural implicada durante el desarrollo digital App-ExploraCítricos v2.0 para dispositivos móviles con sistema operativo Android®.

**Process flow in the programming approach.**

The flow involved in the operation of App-ExploraCítricos v2.0 was based on conventional direct sampling and monitoring activities in the crop field. The digital processes and modules interrelation that record activities and crop field observations directly in the mobile-app were integrated into the Android programming (Figure 1). Likewise, conditional procedures and programmatic, operational and technical exceptions that could be encountered in the evaluation for new or historical sites were considered.

**Database structure and relational tables.** A MySQL® database was developed for information storage generated in App-ExploraCítricos v2.0 mobile device. The internal database structure and relationship implied modular tables or blocks programming of information related to key-variable, primarily determined by a farm site-tracking ID. The variables were segmented into modules that mainly involved planting characterization, on-site assessment, and processing for running information reports, visualization of sampling data associated with plant-by-plant information, or complete summaries of assessments (Figure 2).

**Software, programming language, and validation.** App-ExploraCítricos v2.0 was programmed with free-use tools, open source programming languages, and dedicated servers for metadata storage using Linux/Apache technologies for web settings. Programs such as MySQL/MariaDB and other complementary ones were used as database managers; PHP / Nodejs, JavaScript, Ajax, HTML5, and CSS were used for the back-end and front-end layout. The mobile-app was developed for Android® articulating to web technologies and programming languages associated with the server (PHP, HTML, CSS, etc.)

monitoreo en campo. En la programación Android, se integraron procesos digitales vinculantes e interrelación de módulos que registran actividades y observaciones de campo directamente en la aplicación móvil (Figura 1). Así mismo, se consideraron procedimientos condicionantes y excepciones programáticas, operativas y técnicas que puedan suceder dependiendo de la evaluación de predios nuevos o históricos.

**Estructura de bases de datos y tablas relacionales.**

Se construyó una base de datos MySQL® para almacenamiento de la información generada en App-ExploraCítricos v2.0 en el dispositivo móvil. La estructura y relación de la base de datos interna implicó el desarrollo de tablas o bloques de información modular vinculantes a través de variables clave o 'key-variables', principalmente determinadas por un ID de seguimiento de predios. Las variables fueron segmentadas en módulos que implicaron principalmente caracterización de plantaciones, evaluación en sitios y procesamiento para ejecución de resúmenes de información, visualización de datos de muestreos vinculantes con información planta por planta o resúmenes integrales de las evaluaciones (Figura 2).

**Software, lenguaje de programación y validación.** El desarrollo y programación de App-ExploraCítricos v2.0 se basó en lenguajes de programación y herramientas de uso libre y servidores dedicados para almacenamiento de metadatos configurados con tecnologías Linux/Apache. Se emplearon programas como MySQL/MariaDB y otros complementarios como gestores de bases de datos; PHP / Nodejs, y JavaScript, Ajax, HTML5 y CSS para el maquetado base 'back-end' y 'front-end'. La aplicación móvil se desarrolló para Android® articulada a tecnologías web y lenguajes de programación asociadas al servidor (PHP, HTML, CSS,

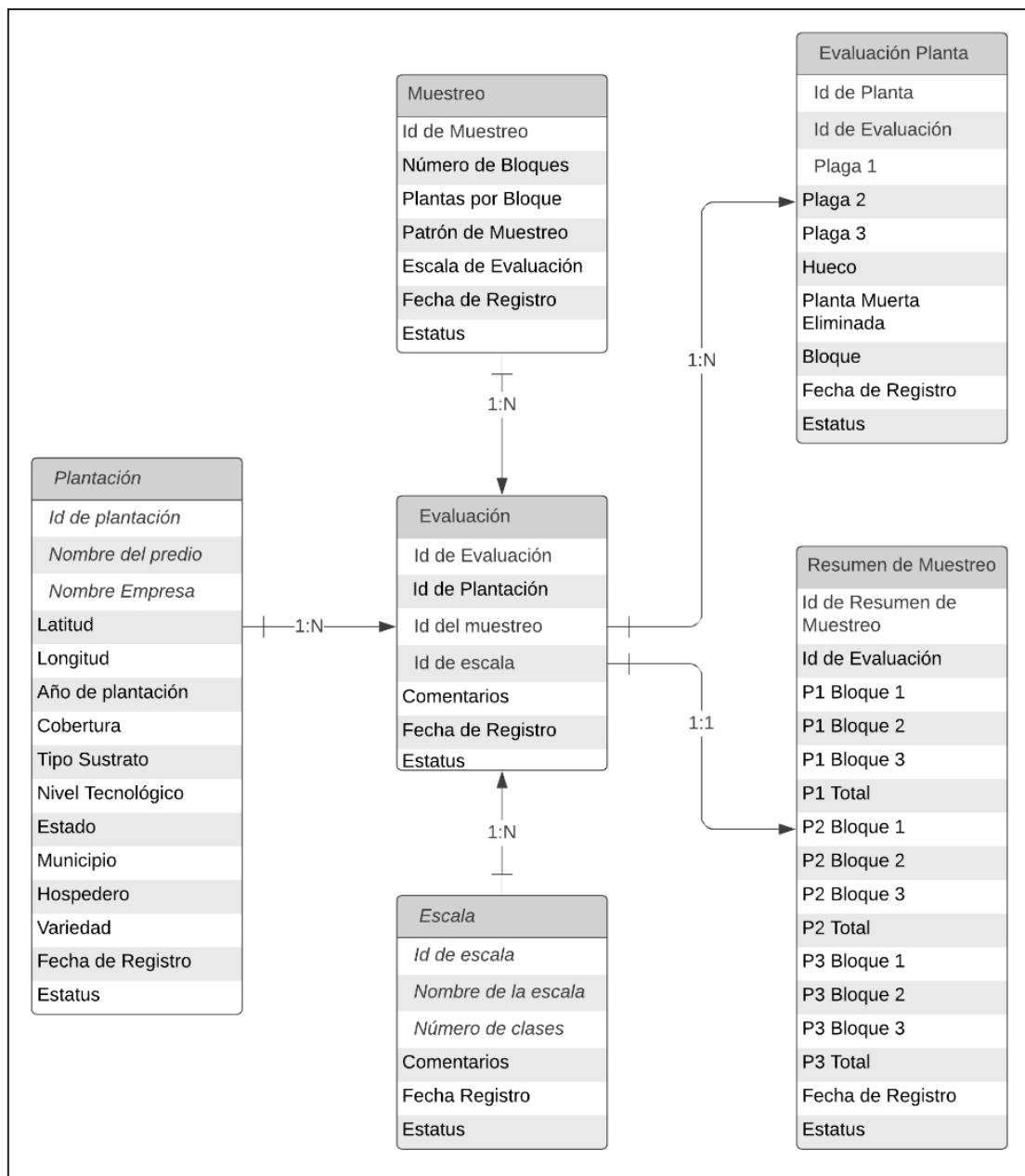


Figure 2. App-ExploraCitricos v2.0 database entity-relationship model designed for crop field dynamic assessment processes, up to real-time reports on mobile device.

Figura 2. Modelo entidad-relación de base de datos de App-ExploraCítricos v2.0 construido para procesos dinámicos de evaluación en campo, hasta la generación de reportes de resultados en tiempo real en el dispositivo móvil.

to generate web services for recording-sending data from the crop field using Wi-Fi or mobile plan. MySQL relational databases and tables were used. Lab validations were performed to ensure suitability for compatibility between mobile systems, automatic verification of geo-localization, record recovery, local data historicity, and supporting. In the crop field, simultaneous validations were performed by 2-5 users in Veracruz, SLP, and Chiapas commercial citrus plantations.

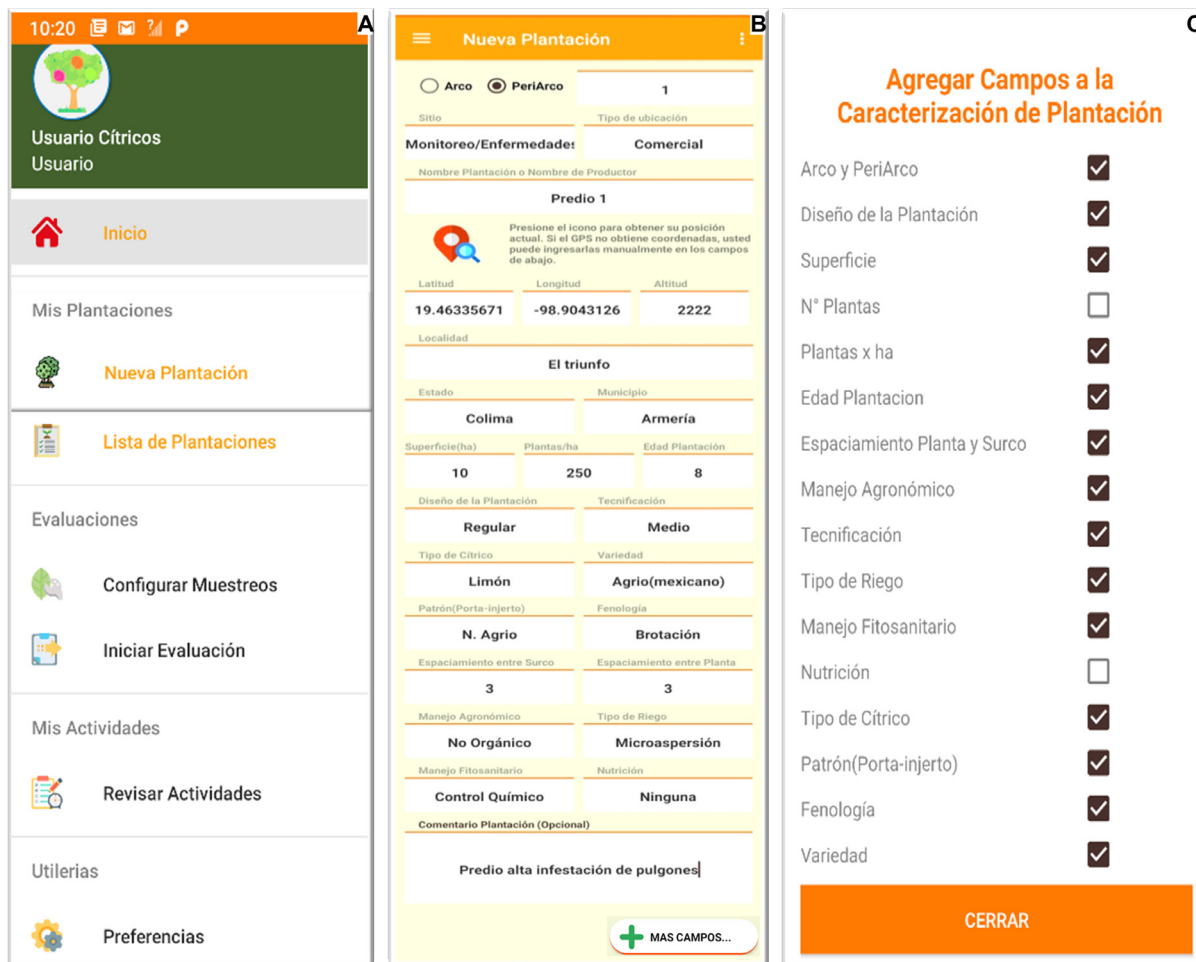
## RESULTS

The final structure of App-ExploraCítricos v2.0 was developed through an interactive-continuous process of crop field validations. The mobile-app configuration is dynamic and aimed to the objective(s) of the user. The process integrated the measurement of epidemiological variables with a spatio-temporal, multicrop, multivariety-species, multivariate, multipest, multiuser and multicriteria approach through sampling and/or monitoring, imagery record about the pests and damage of concern for epidemic traceability in the crop field. The purpose was to provide a comprehensive risk analysis of the productive chain in regional environments. The mobile-app was linked to dynamic databases with a local connection on mobile devices and web environment (Figure 3A). The app was designed under a conceptualization of epidemiological parameterization with 26 variables of the *Epidemiological System* (Figure 3B), customizable by user according to the objective of epidemiological assessment (Figure 3C). The App was developed for Android® devices with versions higher than 6.0 Marshmallow. The crop field validation allowed the assessment of phytosanitary pests in several assessed citrus species. Likewise, the user can add  $n$ -pests of concern for a region or an exploration purposes, in specific categories

etc.) para generar servicios web de registro-envío de datos desde campo mediante wifi o datos móviles. Se emplearon bases de datos y tablas relacionales con MySQL principalmente. Se realizaron validaciones en laboratorio para asegurar la adecuación por compatibilidad entre sistemas móviles, verificación geográfica automática de georreferencias, recuperación de registros, historicidad local datos, e información de soporte. En campo, se realizaron validaciones simultáneas por 2-5 usuarios en 58 plantaciones comerciales de cítricos en Veracruz, SLP y Chiapas.

## RESULTADOS

La estructura final de App-ExploraCítricos v2.0 se desarrolló interactivamente a través de un proceso continuo de validaciones en 58 plantaciones cítricas y la generación de 37700 metadatos. Su configuración es dinámica y orientada al objetivo(s) del usuario. Integró la medición de variables epidemiológicas con enfoque espacio-temporal, multicultivo, multivariedad-especie, multivariable, multiplaga, multiusuario y multicriterio a través de muestreos y/o monitoreos, registro fotográfico de plagas y/o daños de interés para trazabilidad del proceso epidemiológico en campo o fines etiológicos. Esta información tuvo como fin el análisis integral de riesgos de la cadena productiva en entornos regionales. La aplicación móvil se articuló a bases de datos dinámicas con conexión local en dispositivos móviles y en un entorno web (Figura 3A). Se diseñó bajo una conceptualización de parametrización epidemiológica con 26 variables del Sistema Epidemiológico (Figura 3B) y configurable por el usuario en función del objetivo de la exploración epidemiológica (Figura 3C). La App se desarrolló para dispositivos Android® con versiones superiores a 6.0 Marshmallow. Su validación en campo permitió la exploración de problemas



**Figure 3.** Interface example of App-ExploraCítricos v2.0 for sampling and/or monitoring of citrus pests and diseases. A. Initial view ('home') with modules menu. B. Plantations characterization module through 26 agronomic-epidemiological variables. C. Module for configuration of variables selected to integrate the assessment menu according to an official work plan.

**Figura 3.** Ejemplos de interfases de la App-ExploraCítricos v2.0 para muestreo y/o monitoreo de plagas y enfermedades de cítricos. A. Vista inicial ('home') con menú de módulos. B. Módulo de caracterización de plantaciones mediante 26 variables agronómico-epidemiológicas. C. Módulo de configuración de variables a seleccionar para integrar el menú de evaluaciones acorde a un plan o programa de trabajo.

such as insect-pest or insect-vector, and  $n$ -diseases associated with pathogens. In order to use the app, authentication keys are required for login according to a user role (e.g., Technician, Coordinator, Analyst, etc.). The access keys are generated in a web Platform. The design of the app for the official ONPF sector allows synchronized or non-synchronized *in-situ* activities to be carried out in

fitosanitarios en diversas especies cítricas evaluadas. Asimismo, el usuario puede incluir  $n$ -plagas de interés para una región o al propósito exploratorio, en categorías específicas como insecto-plaga o insecto-vector, y  $n$ -enfermedades asociadas con el organismo patógeno. El uso es privado, por lo cual requiere claves de autenticación para su ingreso según un rol de usuario (p.e., Técnico, Coordinador,



23 citrus-producing states nationwide in support of strategies SIFICIT program.

**Record of pests and diseases.** According to a work plan for a time and region scenarios, the mobile-app allows to the user the *n*-pests and *n*-diseases registration associated to citrus crops (Figure 4A and 4B). The registration includes the pest common and scientific name as well as organism type (fungus, virus, bacteria, etc.) (Figure 4C). There are no specific limits to the number of pests or diseases that can be recorded in the mobile-app. A dynamic programming allows the gradual integration of new organisms of concern based on regional incidence, phytosanitary status (surveillance, campaign, exploration, etc.) (Figure 4D).

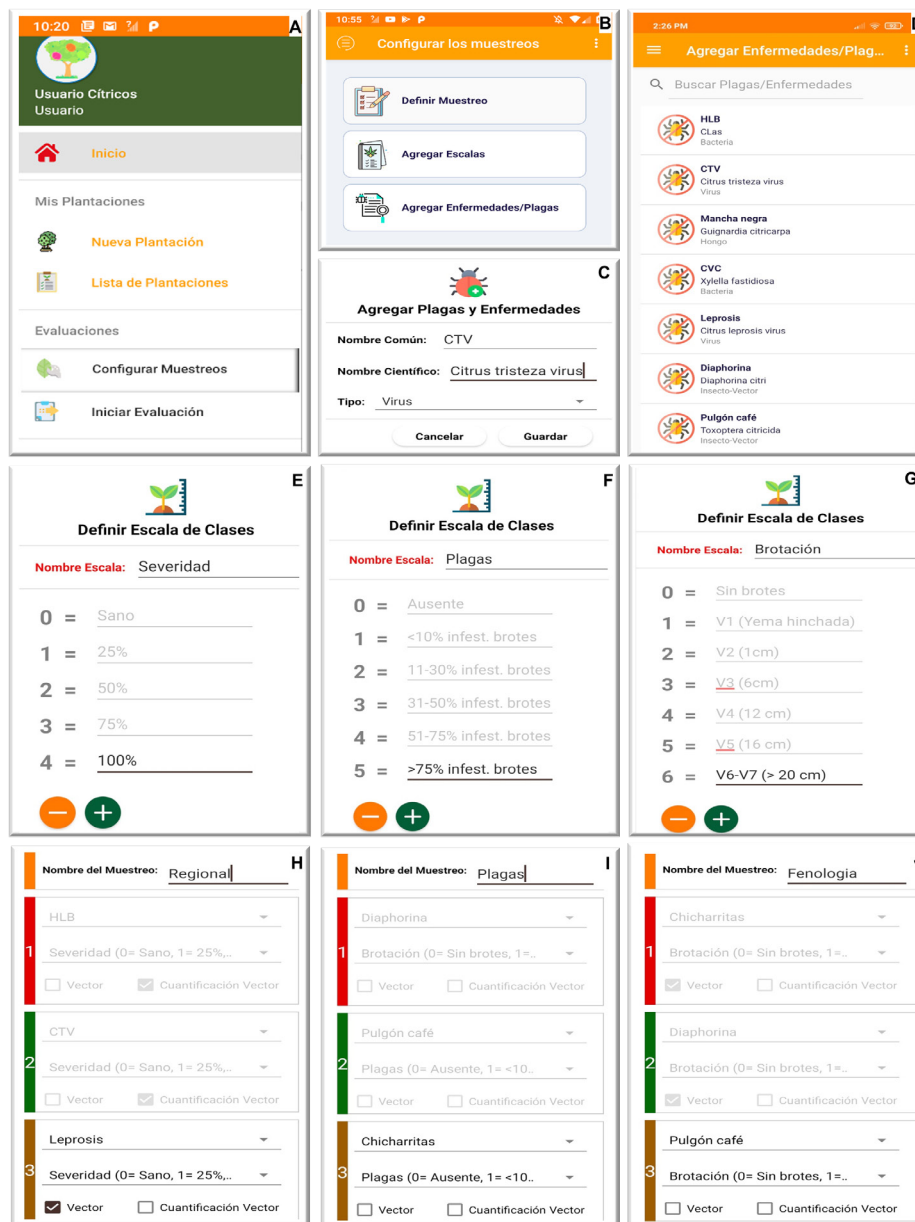
**Assessment scales settings.** This is a dynamic module in which users set the assessment scales specific to the pests and/or diseases of concern. The assessment scales include a number of classes and a respective associated damage level, severity percentage or infestation (Figure 4E-4G). The assessment scale to be used as a qualitative or a quantitative criterion depending on user's objectives or other research criteria. Optimally, these should be based on concurrent research lines or publications accepted by the ONPF. Setting scales provide for harmonization between technicians and differentiation of assessment intensity based on the importance or concern for a particular pest or disease. Therefore, it is suitable for different phytosanitary purposes, including qualitative or quantitative surveillance systems, and research projects for phytosanitary support (Figure 4E-4G).

**Sampling and/or monitoring settings.** The sampling module allows customizing the assessment in the crop field (Figure 4H-4J), by selecting *n*-pests and their scale(s), previously recorded, to

Analista, etc.), generadas en una Plataforma WEB vinculada. La App, en su concepción para el sector oficial ONPF, permite realizar actividades *in situ* sincrónicas o asincrónicas en 23 estados productores de cítricos a nivel nacional en soporte a las acciones del SIFICIT.

**Registro de plagas y enfermedades.** En concordancia con un plan o programa de trabajo en un escenario de tiempo y región, la App permite al usuario registrar las *n*-plagas y *n*-enfermedades asociadas al cultivo de cítricos (Figura 4A y 4B). El registro debe incluir el nombre común y científico de la plaga así como el tipo de organismo (hongo, virus, bacteria, etc.) (Figura 4C). El número o cantidad de plagas o enfermedades que pueden registrarse no tiene un límite específico. Su programación dinámica permite la gradual integración de nuevos organismos de interés en función a su ocurrencia regional, estatus fitosanitario (vigilancia, campaña, exploración, etc.) (Figura 4D).

**Configuración de escalas de evaluación.** Es un módulo dinámico donde el usuario define las escalas de evaluación específicas a las plagas y/o enfermedades de interés. Las escalas de evaluación incluyen el número de clases y su respectivo grado de daño, porcentaje de severidad o infestación asociado (Figura 4E-4G). La escala puede ser cualitativa o cuantitativa según los objetivos o criterios de evaluación del usuario. Idealmente, estas deben basarse en líneas de investigación paralelas o publicaciones aceptadas por la ONPF. La configuración de escalas permite armonizar entre técnicos y diferenciar la intensidad de evaluación según la importancia o interés de una plaga o enfermedad en particular. Este enfoque flexibiliza la App para adecuarse a una realidad compleja y dinámica en entornos regionales y gran escala espacial. Puede por lo tanto aplicarse para diferente propósitos



**Figure 4.** Interface examples of App-ExploraCítricos v2.0 for custom configuration of citrus pest and disease assessment criteria. A. Menu highlighting the sampling configuration module. B. Sampling and evaluation configuration options module. C. Module to register *n*-pests or *n*-diseases by common and scientific name and type of organism. D. Example a pests list registered by the user. E-G. Examples of user-defined scales for severity, infestation and phenology. H-J. Examples of sampling settings by selecting pests, assessment scales, and vector presence or quantification.

**Figura 4.** Ejemplos de interfases de la App-ExploraCítricos v2.0 para configuración personalizada de criterios de evaluación de plagas y enfermedades de cítricos. A. Menú que resalta el módulo de configuración de muestreo. B. Módulo de opciones para configuración de muestreo y evaluación. C. Módulo para registro de *n*-plagas o *n*-enfermedades por nombre común y científico y tipo de organismo. D. Ejemplo de una lista de plagas registradas por un usuario. E-G. Ejemplos de escalas para severidad, infestación y fenología definidas por el usuario. H-J. Ejemplos de configuración de muestreo seleccionando plagas, escalas de evaluación y presencia o cuantificación del vector.

assess damage or severity *in situ* (Figure 4A-4G). Using epidemiological criteria, this module allows quantification of disease-associated vectors (Figure 4H-4J). The quantification can be presence-absence level or counting of adults or other phase/stage of concern. Once the selection and configuration is complete, a name is given to the sample, e.g., 'Weekly Monitoring', saving the customization performed for use in future assessments (Figure 4H-4J). Contrary to monitoring, a sample has no progression through time. The mobile-app conception allows for both inspection processes.

#### **Characterization of epidemiological variables.**

This module is important for a plantation or production unit parameterization. The characterization includes 26 variables grouped by: site geolocation (obtained automatically), productive and epidemiological factors to measure the agronomic condition based on age, citrus species, graft-rootstock, irrigation type, nutrition, management, and other variables associated with *Epidemiological System* that can explain the pest or disease spatio-temporal intensity (Figure 3B). The component is dynamic and customizable according to the criteria or information requirements. An *ad hoc* variable selection module per component makes it possible to optimize the operability and relevance of an epidemiological exploration. This flexibility allows for adjusting the objectives, streamline assessment processes and improve the benefit/cost balance (Figure 3C).

**Registration of new planting.** This module allows the registration of new plantations in a local or regional environment according to pre-defined criteria for selection in a phytosanitary program. Registration of a new plantation also allows assignment of a unique ID or tracking key which allows historical traceability for monitoring

fitosanitarios, incluyendo sistemas de vigilancia cualitativos o cuantitativos y proyectos de investigación de soporte fitosanitario (Figura 4E-4G).

**Configuración de muestreo y/o monitoreo.** El módulo de muestreo permite personalizar la evaluación en campo (Figura 4H-4J), seleccionando *n*-plagas y su escala(s) de evaluación para medición de daño o severidad *in situ* registradas previamente (Figura 4A-4G). Adicionalmente, con criterios epidemiológicos, en este módulo es posible cuantificar los vectores asociados a enfermedades (Figura 4H-4J). La cuantificación puede ser a nivel de presencia-ausencia o contabilización directa de adultos u otra fase/estadio de interés. Al finalizar la selección y configuración, se asigna un nombre al muestreo, p.e., 'Monitoreo Semanal', el cual en futuras evaluaciones guardará la personalización realizada para usarse posteriormente (Figura 4H-4J). Contrario al monitoreo, un muestreo no tiene una progresión en el tiempo. La App permite ambos procesos de inspección.

#### **Caracterización de variables epidemiológicas.**

Este módulo es importante para la parametrización de una plantación o unidad de producción. Incluye 26 variables agrupadas por: geolocalización del sitio (obtenida automáticamente), aspectos productivos y epidemiológicos para determinar la condición agronómica basada en edad, especie cítrica, injerto-portainjerto, tipo de riego, nutrición, manejo y otras variables asociadas al *sistema epidemiológico* y que pueden explicar la intensidad espacio-temporal de una plaga o enfermedad (Figura 3B). Este componente es dinámico y configurable según los criterios o requisitos de información. Un módulo de selección de variables *ad hoc* por componente permite optimizar la operatividad y pertinencia de una exploración epidemiológica. Esta flexibilidad permite ajustar objetivos, agilizar procesos de

purposes and geolocation for analytical purposes (Figure 3A). In each plantation,  $n$ -variables of agronomic and phytosanitary management are recorded, previously preconfigured by the user for a specific official phytosanitary program (Figure 3C). These variables were conceived as part of the *Epidemiological System* and are essential for the risk analysis scenarios. Thus, for example, the citrus species and variety, the graft-rootstock, irrigation type, agronomic and phytosanitary management, foliar nutrition, soil, or combinations can explain the higher or lower HLB or CTV prevalence in each assessment site and can be integrated using algorithms for a regional risk factor.

**Crop field assessment.** At the start of the process,  $n$ -plants can be assessed according to the needs of the user or of a phytosanitary program. The field assessment module has no restriction on the number of plants, but preferably should be predetermined standardization purposes. In each plant is possible to assess the selected set of pests with their respective scale, as well as optionally indicate the presence, absence or quantification of vector(s) (Figure 5B, 5C). In addition, for each plant assesses, specific symptoms can be recorded with up to three images, in which kind of organ/tissue is recorded, a descriptive note added and the imaged plant is geopositioned (Figure 5D). Once the assessment is completed, the main view shows the phytosanitary status of the plant, showing whether symptoms of a pest are present, vector(s), image(s) and the georeference (Figure 5E).

**Quantitative reports of a crop field assessment.** This module counterpart the automatic preliminary visualization that is generated at the end of  $n$ -plants assessment in a citrus farm (Figure 5E), considered as a population unit of test or monitoring. The report generated in this module is more descriptive and quantitative (Figure 6A – 6C). The interface

evaluación y un correcto balance beneficio/costo (Figura 3C).

**Registro de nueva plantación.** Este módulo permite el registro de nuevas plantaciones en un entorno local o regional según criterios preestablecidos de selección de predios en un programa fitosanitario. El registro de una nueva plantación permite la asignación de un ID o clave de seguimiento único, lo cual permite la trazabilidad histórica con fines de monitoreo o para geolocalización con fines analíticos (Figura 3A). En cada plantación se registran  $n$ -variables de manejo agronómico y fitosanitario que previamente se preconfiguran por el usuario para un programa fitosanitario específico (Figura 3C). Estas variables son concebidas como parte del *sistema epidemiológico* y son fundamentales para el análisis de escenarios de riesgo. Así, por ejemplo, la especie de cítrico y variedad, el injerto-portainjerto, tipo de riego, manejo agronómico y fitosanitario, aspectos de nutrición foliar, suelo o combinaciones pueden explicar la mayor o menor prevalencia de HLB o CTV en un predio dado e integrarse mediante algoritmos para un factor de riesgo regional.

**Evaluación en campo.** Este módulo permite seleccionar un predio registrado previamente y almacenado residentemente en la App, una escala(s) de evaluación y la plaga(s) y/o enfermedad(es) de interés (Figura 5A). Al iniciar el proceso,  $n$ -plantas pueden ser evaluadas según las necesidades del usuario o de un programa fitosanitario. El módulo de evaluación en campo no restringe el número de plantas, pero idealmente debe ser prefijado con fines de estandarización. En cada planta es posible evaluar el conjunto de plagas seleccionadas con su respectiva escala, así mismo opcionalmente se puede indicar la presencia o ausencia de un vector(es) o su cuantificación (Figura 5B, 5C). Adicionalmente, por cada evaluación de planta se pueden documentar síntomas específicos mediante

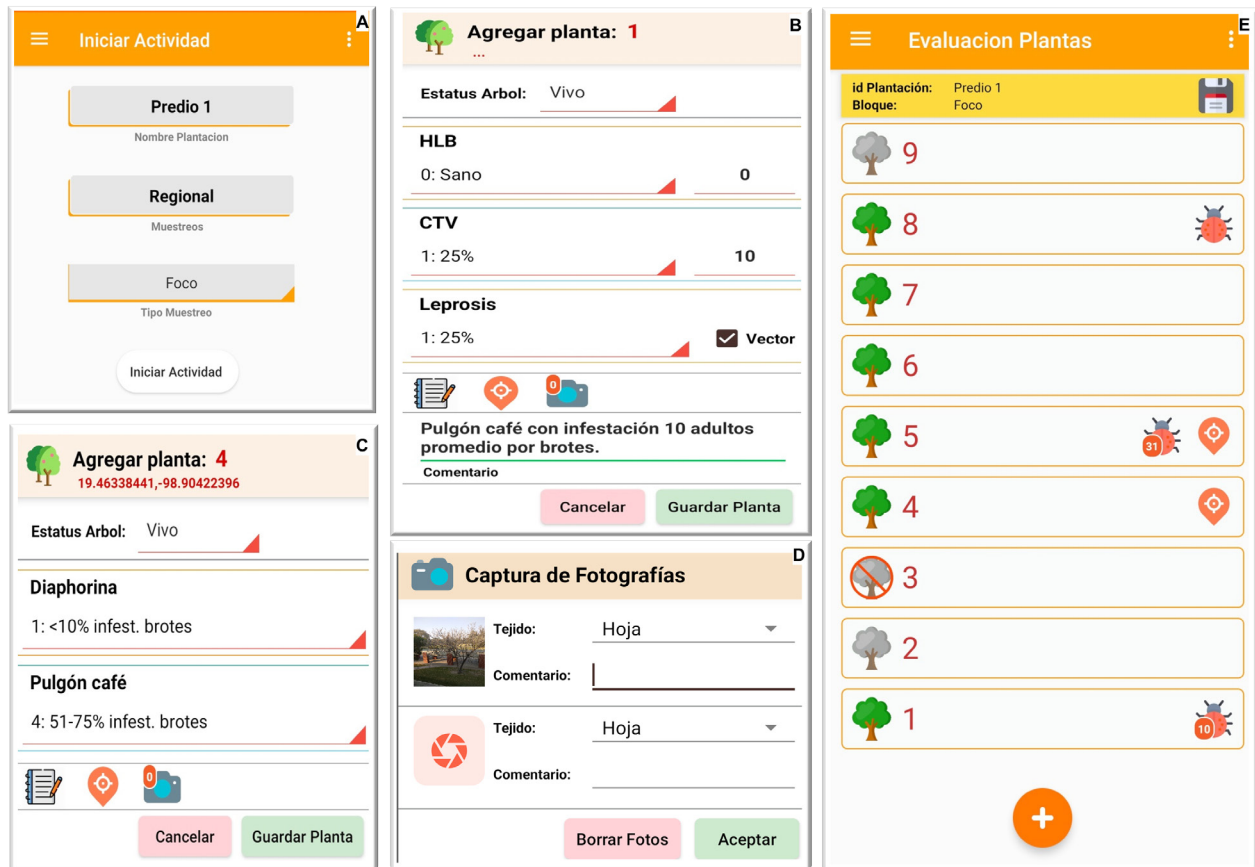
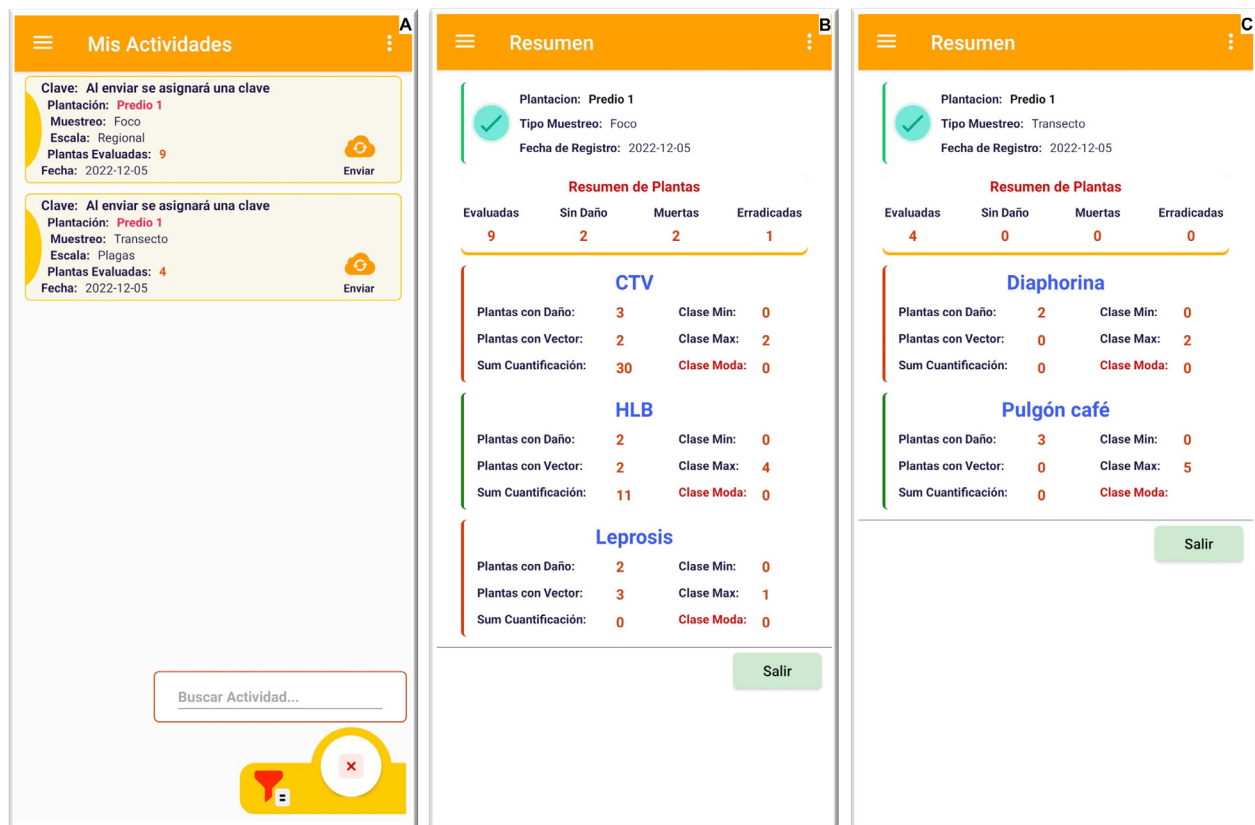


Figure 5. Interface examples of the App-ExploraCítricos v2.0 for the start and assessment process of citrus plantations in the crop field. A. Initial activity module that allows selecting a farm (*Farm 1*), sampling type (*Regional*) and area of assessment (*Foco*). B. Unit plant assessment module shows the pests selected in the settings. The example for *plant 1* shows the presence of HLB, CTV and Leprosis, with severity assessments of health, 25% and 25%, respectively. At the end, an additional comment indicating a vector infestation of 10 adults of *Toxoptera citricida* per bud. C. Example of *plant 4* with presence of *D. citri* and *T. citricida* (insect pest/vector) with scale value less than 10% and 51-75% of infested shoots, respectively. D. Section for capturing georeferenced images in which tissue type (leaf) can be placed with an associated comment. E. Comprehensive view of assessment status with 9 plants. Iconography is shown for plants (*p*) with quantification of a pest with 10 adults (*p-1*), standing dead tree (*p-2* and *p-9*), eradicated (*p-3*), georeferenced plant suspected to a pest (*p-4*), georeferenced plant with quantification of 31 adults (*p-5*), healthy (*p-6* and *p-7*), plant with pest incidence (*p-8*).

Figura 5. Ejemplo de interfaces de la App-ExploraCítricos v2.0 para inicio y proceso de evaluación de plantaciones de cítricos en campo. A. Módulo inicial de actividades que permite seleccionar un predio (*Predio 1*), tipo de muestreo (*Regional*) y área de evaluación (*Foco*). B. Módulo de evaluación de plantas unitarias en el cual se muestra las plagas seleccionadas en la configuración. En el ejemplo para *planta 1* se muestra presencia de HLB, CTV y Leprosis, con evaluaciones de severidad sano, 25% y 25%, respectivamente. Al final un comentario adicional indicando una infestación de vector de 10 adultos de *Toxoptera citricida* por brote. C. Ejemplo de la *planta 4* con presencia de *D. citri* y *T. citricida* (insectos plaga/vector) con valor de escala menor a 10% y 51-75% de brotes infestados, respectivamente. D. Sección de captura de imágenes georreferenciadas en las cuales se puede colocar tipo de tejido (*hoja*) con un comentario asociado. E. Vista integral del estatus de la evaluación con 9 plantas. Se muestra iconografía para plantas (*p*) con cuantificación de una plaga con 10 adultos (*p-1*), árbol muerto en pie (*p-2* y *p-9*), erradicado (*p-3*), planta georreferenciada sospechosa a una plaga (*p-4*), planta georreferenciada con cuantificación de 31 adultos (*p-5*), sanas (*p-6* y *p-7*), planta con incidencia de una plaga (*p-8*).





**Figure 6.** Interface examples of App-ExploraCítricos v2.0 for visualization of assessed farms and consulting reports reports of phytosanitary assessments in citrus farms. A. ‘My Activities’ module shows a list and general attributes of assessed farms during day(s). B. Example of a quantitative table ‘Report’ with records of diseased plants associated to CTV, HLB, and Leprosis for Farm 1 in a ‘Focus’ sampling type. C. Example of a ‘Report’ with records of plants infested associated to pests ‘Diaphorina’ (*D. citri*) and ‘Pulgón café’ (*T. citricida*). The vector category is only selected if the respective pathogen has been confirmed by diagnostic in the sampling region.

**Figura 6.** Ejemplo de interfases de la App-ExploraCítricos v2.0 para visualización de predios evaluados y consulta de resúmenes de evaluaciones sanitarias de campo en predios cítricos. A. Módulo de ‘Mis Actividades’ en el que se muestra la lista y atributos generales de predios evaluados durante el día(s). B. Ejemplo de un ‘Resumen’ tabular cuantitativo con registros de plantas enfermas con CTV, HLB y Leprosis para el Predio 1 en un muestreo en Foco. C. Ejemplo de un ‘Resumen’ con registros de plantas infestadas con las plagas ‘Diaphorina’ (*D. citri*) y ‘Pulgón café’ (*T. citricida*). La categoría de vector se selecciona únicamente si se ha confirmado por laboratorio el patógeno respectivo en la región de muestreo.

is controlled and consulted by the user through a list of farms assessed and registered in the resident memory of mobile device (Figure 6A). When selecting a farm of concern and option ‘see Report’ (Figure 7A), the summary of the assessment registered for that farm is displayed as table. The report includes the farm number, sampling type, date, all plants detected by pest or disease category,

tres fotos máximo, en las cuales se registra tipo de órgano/tejido, se incluye una nota descriptiva y se geoposiciona la planta fotografiada (Figura 5D). Al realizar la evaluación, en la vista principal se muestra el estatus fitosanitario de la planta, indicando si es sintomática de alguna plaga, si está presente un vector(es), si incluye foto(s) y la georreferencia correspondiente (Figura 5E).



Figure 7. Interface of the App-ExploraCítricos v2.0 for the management of assessment records of citrus farms. A. Log management options include 'Sending' to the web repository using Wi-Fi or mobile plan; 'Export' in MS Excel; and see 'Comprehensive Reports' of an assessment at 'Farm' level. B. Automatic view indicating that only the 'Export' and 'Report' options are functional due to local lack connectivity. C. Example of a report on the successful sending of a record/farm to the web repository. List of core modules successfully submitted and a ID assigned to the farm. In case of failures or missing data per module, an error icon indicates it. D. View of options to export data from MS Excel for each farm. They include mail, bluetooth, drive, and social networks like MSN or others.

Figura 7. Interfase de la App-ExploraCítricos v2.0 para la gestión de registros de evaluaciones de predios citrícolas. A. Opciones para gestión de registros incluyen 'Enviar' a un repositorio web mediante red wifi o datos móviles disponibles; 'Exportar' en MS Excel; y 'ver Resumen' integral de una evaluación a nivel 'Predio'. B. Vista automática que indica que únicamente las opciones 'Exportar' y ver 'Resumen' son funcionales por ausencia de conectividad local. C. Ejemplo de reporte de envío exitoso de un registro/predio al repositorio web. Enlista los módulos principales enviados exitosamente, una clave asignada al predio. En caso de fallas o datos faltantes por modulo un icono de error lo indica. D. Vista de opciones para exportar datos de MS Excel por predio. Incluyen Mail, bluetooth, drive y redes sociales como MSN u otras.

and the range of severity/infestation. The Figure 6B illustrates the report of Farm 1 for a sample type 'Focus' (i.e., a spatial aggregate of plants that have a phytosanitary pests of economic or quarantine concern), with records of plants associated with putative symptoms to CTV, HLB, and Leprosis. The Figure 6C shows the example for Farm 1 with a 'Transect' sample (i.e., sampling at kilometer intervals within a geographic route selected by risk criteria due to transport of fruit, citrus plants, harvesters, etc.).

**Sending assessment carried out.** This is a straightforward module that consists of sending the record of an assessment performed in a day(s) of crop field (Figure 7). The sending is controlled by the user determining the ideal time to send assessments at repository or web system for management of massive data from  $n$ -evaluators. In this research, the SIFICIT system was developed for this purpose. Based on crop field tests and validations, the sending is suggested to perform with Wi-Fi or a 'mobile plan' only with 3G or 4G signal (Figure 7A and 7B). Once sent the assessments, a report of records entered in the web system is displayed, if errors were occurs in the process an icon indicates any failure for traceability purposes (Figure 7C). Additionally, when selecting a farm of concern, consulting the 'Report' of the crop field assessment is possible, download data in MS Excel, and sending through any resources available on the smartphone such as email, bluetooth, drive, or others (Figure 7D). These last options allow providing the crop field technician with necessary information for customized reports to cooperating growers of assessed farms, productive associations, and local phytosanitary managers. Note that a web system is designed to generate automatic reports focused on decision-making and early warnings. Therefore, the technician also has this virtual resource.

**Resumen cuantitativo de una evaluación en campo.** Este módulo complementa la visualización preliminar automática que se genera al finalizar la evaluación de  $n$ -plantas en un predio citrícola (Figura 5E), considerado éste como unidad poblacional de muestreo o monitoreo. El resumen generado en este módulo es más descriptivo y cuantitativo (Figura 6A - 6C). La interfase es controlada y consultada por el usuario a través de una lista de predios evaluados y registrados en la memoria residente del dispositivo móvil (Figura 6A). Al seleccionar un predio de interés y la opción 'ver Resumen' (Figura 7A), se muestra tubularmente el resumen de la evaluación sanitaria registrado para ese predio. Incluye el número de predio, tipo de muestreo, fecha, la totalidad de plantas detectadas por categoría de plaga o enfermedad, y el rango de daño/infestación. La Figura 6B ilustra el resumen del Predio 1 para un tipo de muestreo en 'Foco' (i.e., un agregado espacial de plantas que poseen un problema sanitario de interés económico o cuarentenario), con registros de plantas con síntomas putativos a CTV, HLB y Leprosis, mientras que la Figura 6C muestra el Predio 1 de un muestreo en 'Transecto' (i.e., muestreo a intervalos de kilómetros dentro de una ruta geográfica seleccionada por criterios de riesgo debido a transporte de fruta, plantas de cítricos, cosechadores, etc.).

**Envío de evaluaciones realizadas.** Es un módulo simple que consiste en enviar el registro de una evaluación(es) realizadas en un día(s) de trabajo en campo (Figura 7). El envío es controlado por el usuario en todo momento, por lo que éste determina el momento ideal para realizar el envío a un repositorio o sistema web preconfigurado para la gestión de datos masivos provenientes de  $n$ -evaluadores. En esta investigación, se desarrolló el sistema SIFICIT para ese fin. Con base en pruebas y validaciones de campo se sugiere realizar con WiFi o 'plan de

**Review of activities and App settings.** The mobile-app has a module that allows the user to review the status of activities performed and accumulated during a period (interface not shown). This allows consulting the assessments sent, pending completion in a specific farm, or pending of send to the web repository. If Wi-Fi internet connection or 'mobile plan' is not available, only the consulting reports and export files to share via email and other social networks or send are allowed. The data recorded in the device's resident memory is never lost, even if the battery disables the device during an assessment in the crop field, so the availability is guaranteed for local use, re-assess, or shipment when connectivity conditions allow it. Once a record was sent to web repository, this option is disabled to avoid duplication of information and to avoid compromising the performance of algorithms designed for decision-making in a web system. The mobile-app allows and guarantees that crop field actions are protected against any sending problems. Some components are included, such as the selection of GPS accuracy selection based on the available mobile device, even sending backups and a database copy hosted locally to support technicians with possible shipments problems.

## DISCUSSION

The use of digital tools for implementation in operational surveillance systems under the preventive approach have shown the assertiveness to articulate phytosanitary management programs based on decision making assisted by automated algorithms and management of large volumes of data in real-time (Mora- Aguilera *et al.*, 2021). *Prevention* implies a regional approach and a set of decision criteria and dynamic early warnings differentiated by agroecological conditions (Mora-

datos' únicamente si la receptividad es 3G ó 4G (Figura 7A y 7B). Una vez enviado, se muestra un resumen de los registros ingresados al sistema web y en caso de errores, un icono indica cualquier falla con fines de trazabilidad (Figura 7C). Adicionalmente, al seleccionar un predio de interés es posible consultar el 'Resumen' de la evaluación de campo, descargar datos en MS Excel y enviar por alguno de los recursos disponibles en el smartpho- ne como el correo electrónico, bluetooth, Drive u otro (Figura 7D). Estas últimas opciones permiten proporcionar al técnico de campo la información necesaria para reportes personalizados a productores cooperantes de predios evaluados, asociaciones productivas y directivos fitosanitarios locales. Notar que un Sistema web esta diseñado para generar reportes automáticos enfocados a toma de decisiones y alertas tempranas. Por lo que el técnico también cuenta con este recurso virtual.

**Revisión de actividades y configuración de la App.** La App posee un módulo que permite al usuario la revisión del estatus de actividades realizadas y acumuladas durante un periodo (interfase no mostrada). Este permite consultar las evaluaciones enviadas, pendientes de terminar en un predio específico, o pendientes de enviar al repositorio web. En caso de no contar con una conexión de internet WiFi o 'plan de datos', únicamente es permitido realizar consultas de resúmenes y exportar archivo para compartir vía mail y otras redes sociales o envío. Los datos registrados en la memoria residente del dispositivo nunca se pierden, aun si la batería deshabilita el dispositivo durante una evaluación en campo, por lo que esta garantizada su disponibilidad para uso local, retomar una evaluación, o envío cuando las condiciones de conectividad lo permitan. Una vez que un registro es enviado a un repositorio web, esta opción se deshabilita para evitar duplicidad de información y para no

Aguilera *et al.*, 2021; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2016). This is currently possible with the digital technology, its economy and connectivity coverage (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014c). However, despite their effectiveness, surveillance systems that integrate a web interface and mobile applications have been limited mainly to the scope of NPPOs or RPPOs (Regional Plant Protection Organizations) and in few productive chains such as coffee (*Coffea arabica*), blue agave (*Agave tequilana*) and citrus (*Citrus* spp.) (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

The experience with Surveillance Systems classified as level 3 shows the requirement of sophisticated Apps designed to evaluate a wide set of variables such as phenology, inoculum loads, crop damage, production, etc. Its function, in conjunction with a web environment, is the generation of effective early warnings for the intervention of an epidemic process. However, Surveillance Systems type 1 and 2, have pest detection at regional level as the main purpose (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). In these cases, digital systems have lacked the productive contextualization due to the emphasis on pest inspection. The App-ExploraCítricos v2.0 fills this gap by integrating 26 variables of the productive system to identify anthropocentric predisposing factors in the pests occurrence of economic or quarantine importance. For example, the differential predisposition of sour citrus over sweet citrus to CLas infection is widely recognized (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a, 2014b). The App also incorporates personalized configuration in the entire structural conception of the digital model of health management. Thus, for example, it is possible to delimit from the 26 productive variables those to be recorded specifically for the purpose of an epidemiological diagnosis in a region of interest, making evaluations more expeditious. Likewise, specific pests of interest in such diagnosis can be

comprometer el desempeño de algoritmos concebidos para toma de decisiones de un sistema web. La App permite y garantiza que las acciones de campo se protejan ante cualquier problema de envío. Se incluyen algunos componentes como selección de la precisión GPS en función del teléfono disponible, hasta envío de respaldos y copia de base de datos alojadas en el teléfono para apoyar a técnicos con posibles problemas en envíos.

## DISCUSIÓN

El uso de herramientas digitales para implementación en sistemas de vigilancia operativos y con enfoques preventivos han mostrado la asertividad y necesidad para articular programas de manejo fitosanitario basados en toma de decisiones asistidas por algoritmos automatizados y gestión de grandes volúmenes de datos en tiempo real (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). La *prevención* implica un enfoque regional y un conjunto de criterios de decisión y alertas tempranas dinámicas diferenciadas por condiciones agroecológicas (Mora-Aguilera *et al.*, 2021; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2016). Actualmente esto es posible con la tecnología digital, su economía y cobertura de conectividad (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014c). Sin embargo, a pesar de su efectividad, los sistemas de vigilancia que integran una interfaz web y aplicaciones móviles se han limitado principalmente al ámbito de ONPFs o ORPFs (Organismos Regionales de Protección Fitosanitaria) y en pocas cadenas productivas como cafeto (*Coffea arabica*), agave azul (*Agave tequilana*) y cítricos (*Citrus* spp.) (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

La experiencia con Sistemas de Vigilancia tipificados como nivel 3 es que requieren App sofisticadas diseñadas para evaluar un amplio conjunto de variables como fenología, cargas de inóculo,



recorded. For example, the inclusion of CTV, HLB and Leprosis, current priorities of the AMEFIs (<https://acortar.link/oLCu0l>), instead of all citrus pests of economic interest present in Mexico (<https://acortar.link/tCjHx9>).

The configuration of flexible and independent scales is also one of the great successes of the App to confer greater precision in the health risks characterization as opposed to other fixed and disease specialized approaches (Pethybridge and Nelson, 2018; Pethybridge and Nelson, 2015). The presence or absence of a pest is a very limited attribute for making strategic decisions such as eradication or exclusion with strong commercial implications. The 'Regulatory' Surveillance Systems type 1 and 2, have as main purpose to update the pests official lists in an NPPO in adherence to the original conception of the International Standard for Phytosanitary Measures 6 and 5 (ISPM 6, ISPM 5), published by the International Plant Protection Convention (IPPC), endorsed by FAO (<https://www.ippc.int/es/>), where surveillance is defined as '*An official process to collect and record information on the presence or absence of a pest through the use of surveys, monitoring or other procedures*' (ISPM 5). These systems were not intended for phytosanitary intervention using *preventive* or *protective* approaches, this is the essence of Type 3 Surveillance Systems (Mora-Aguilera *et al.* 2021).

The potential applicability of App ExploraCítricos v2.0 in official phytosanitary strategies has been emphasized. However, its simplicity and flexibility were intended for eventual use by the productive sector or researchers at the field unit level. The download options in MS Excel format and delivery via virtual network options were intended for field units use without a web repository. Sanitary monitoring under the responsibility of the productive sector has not been

daño, producción, etc. Su función, en conjunción con un entorno web, es la generación de alertas tempranas efectivas para la intervención de un proceso epidémico. Sin embargo, Sistemas de Vigilancia tipo 1 y 2, tienen como fin principal la detección de una plaga en un ámbito regional (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). En este caso, los sistemas digitales han adolecido de la contextualización productiva por el énfasis en la inspección de la plaga. La App ExploraCítricos v2.0 subsana este vacío al integrar 26 variables del sistema productivo para identificar factores de predisposición antropocéntricas en la ocurrencia de plagas de importancia económica o cuarentenaria. Por ejemplo, la predisposición diferencial de cítricos agrios sobre los dulces a CLas es ampliamente aceptada (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a, 2014b). La App también incorpora la configuración personalizada en toda la concepción estructural del modelo digital de gestión sanitaria. Así, por ejemplo, se puede acotar de las 26 variables productivas aquellas que se desean registrar para los objetivos de un diagnóstico epidemiológico en una región en particular, haciendo más expeditas las evaluaciones. Así mismo, se pueden registrar las plagas específicas que en dicho diagnóstico son de interés. Por ejemplo, CTV, HLB y Leprosis, prioridades actuales de las AMEFIs (<https://acortar.link/oLCu0l>), como alternativa a la totalidad de plagas de los cítricos de interés económico presentes en México (<https://acortar.link/tCjHx9>).

La configuración de escalas flexibles e independientes es también uno de los grandes aciertos de la App para conferir mayor precisión en la caracterización de riesgos sanitarios en contraposición a otros enfoques fijos y especializados a una enfermedad (Pethybridge y Nelson, 2018; Pethybridge y Nelson, 2015). La presencia o ausencia de una plaga es un atributo muy limitado para toma de decisiones estratégicas como *erradicación* o *exclusión* con fuertes implicaciones comerciales. Los Sistemas

adopted as a productive culture. However, under the current social and environmental demands, the increase of certification programs for commercial, organic production, food safety, and sanitary fields (for example, plots for free-virus buds production), and the generalization of digital technology in transition to the ‘internet of things’ will make it essential to adopt productive digital traceability.

The design of simple, iconographic, flexible, and intuitive Apps will be essential for the adoption of these technologies (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). App ExploraCítricos incorporates iconography for this purpose. Additionally, the authors, with a similar conception, generated App Monitor v2.1 available in ‘Play store’ for any crop and without the need for user authentication and web repositories, a restriction of other generic Apps (Aanensen *et al.*, 2009). The feasibility of programming Apps with Android® has favored the development of mobile applications for agricultural and phytosanitary use in recent years. However, the epidemiological and productive systemic conception has been neglected, affecting its functionality, the excessive processes fragmentation, and emphasis on orchard/field visions (Pethybridge and Nelson, 2018; Pethybridge and Nelson, 2015). Understanding an epidemiological process is essential for the development of relevant and transversal digital technologies. Thus, in the context of the COVID-19 emergency, the vision and epidemiological principles used in this work allowed the generation of a qPCR diagnostic protocol articulated with ambulatory digital surveillance (Mora-Aguilera *et al.*, 2022).

The conception of digital models with the rational framework of the *Epidemiological System*, and the plant (crop) as the integrating phytosanitary axis, guarantees the *holistic-systemic* vision to which phytosanitary programs must move in the face of the growing demand for healthy and sufficient food,

de Vigilancia ‘Normativa’ tipo 1 y 2, tienen como propósito principal la elaboración de listas oficiales de plagas en un ONPF en adherencia a la concepción original de la Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias 6 y 5 (NIMF 6, NIMF 5), publicadas por la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), adscrita a la FAO (<https://www.ippc.int/es/>), donde se define a la vigilancia como ‘*Un proceso oficial para recopilar y registrar información sobre la presencia o ausencia de una plaga mediante el uso de encuestas, monitoreo u otros procedimientos*’ (NIMF 5). Estos sistemas no tuvieron como fin aplicarse a modelos fitosanitarios de intervención con fines *preventivos* o *protectivos*, esencia de los Sistemas de Vigilancia tipo 3 (Mora-Aguilera *et al.* 2021).

Se ha enfatizado la potencial aplicabilidad de App ExploraCítricos v2.0 en modelos oficiales fitosanitarios. Sin embargo, su simplicidad y flexibilidad tuvo como propósito el eventual uso por el sector productivo o investigadores a nivel parcelario. Las opciones de descarga en formato MS Excel y en envío por opciones de redes virtuales tuvieron como fin el uso parcelario prescindiendo de un repositorio web. El monitoreo sanitario bajo responsabilidad del sector productivo no se ha adoptado como una cultura productiva. Sin embargo, ante exigencias sociales y ambientales, el incremento de diversos programas de certificación en el ámbito comercial, orgánico, inocuidad, sanitario (p.e., lotes para producción de yemas libres) y la generalización de la tecnología digital en transición hacia el ‘internet de las cosas’ harán imprescindible la adopción de la trazabilidad digital productiva.

El diseño de Apps simples, iconográficas, flexibles e intuitivas serán fundamentales para la adopción de estas tecnologías (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). App ExploraCítricos incorpora iconografía en este propósito. Adicionalmente, los autores, con una concepción análoga, generaron App Monitor

resilience of productive systems to climate change, environmental care, and preservation of productive resources (i.e., soil, plant genetic resources, water). However, phytosanitary digitization implies innovation challenges in the scientific-technological field, institutional management models and regional sanitary operating systems (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

It is urgent to promote digital technological initiatives to avoid delays of the NPPOs in the insertion of Agriculture 4.0, before aspiring to the next technological generation, 5.0, where countries such as China and Japan are already exploring. Agriculture 4.0, currently led by supplies companies, i.e., fertilizers, pesticides, automation, and robotics, respond to strong commercial interests and do not necessarily favor the vision of health *prevention* and the preservation of regional productive resources ([https://play.google.com/store/apps/details?id=com.app.syngentasoluciones&hl=es\\_MX&gl=US](https://play.google.com/store/apps/details?id=com.app.syngentasoluciones&hl=es_MX&gl=US); <https://play.google.com/store/apps/details?id=mx.bayer.micultivo&hl=es&gl=US>). Technological, democratic, and inclusive digitization is a goal aligned with the humanistic spirit of agriculture and the urgent demand for new agricultural paradigms, including conservation, organic, and agroecological agriculture, oriented towards the sustainability of environmental resources.

## CONCLUSIONS

The functional prototype App-ExploraCítricos v2.0 is a digital innovation for comprehensive citrus pest surveillance. The systemic conception, modular structure, and flexible setting for multi-pest sampling and monitoring according to the regional diversity of citrus production systems provide to this development a great potential to be used in the

v2.1 disponible en 'Play Store' para cualquier cultivo y sin necesidad de autenticación de usuario y repositorios web, una restricción de otras Apps genéricas (Aanensen *et al.*, 2009). La factibilidad de programación de Apps con Android® ha favorecido en los últimos años el desarrollo de aplicaciones móviles para uso agrícola y fitosanitario. Sin embargo, se ha descuidado la concepción sistémica epidemiológica y productiva afectando su funcionalidad, la fragmentación excesiva de los procesos y énfasis en visiones parcelarias (Pethybridge y Nelson, 2018; 2015). La comprensión de un proceso epidemiológico es fundamental para el desarrollo de tecnologías digitales pertinentes y transversales. Así, ante la emergencia de COVID-19 la visión y principios epidemiológicos empleados en este trabajo permitió la generación de una propuesta de diagnóstico qPCR articulado a una vigilancia digital ambulatoria (Mora-Aguilera *et al.*, 2022).

La concepción de modelos digitales con el marco racional del *sistema epidemiológico*, y la planta (cultivo) como eje integrador de la sanidad, garantiza la visión *holística-sistémica* a la que programas fitosanitarios deben transitar ante la creciente demanda de alimentos sanos y suficientes, resiliencia al cambio climático de los sistemas productivos, cuidado ambiental, y preservación de los recursos productivos (i.e., suelo, acervo vegetal, agua). Sin embargo, la digitalización fitosanitaria implica retos de innovación en los ámbitos científico-tecnológico, modelos de gestión institucionales y sistemas operativos sanitarios regionales (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

Es urgente impulsar iniciativas tecnológicas digitales para evitar rezagos de los ONPF en la inserción de la Agricultura 4.0, antes de aspirar a la siguiente generación tecnológica, la 5.0, donde ya incursionan países como China y Japón. La Agricultura 4.0, actualmente liderada por empresas de insumos, i.e., fertilizantes, agrotóxicos,

management and prevention of phytosanitary risks. App-ExploraCítricos was validated in 58 sour and sweet citrus plantations of San Luis Potosí, Veracruz, and Chiapas states for regional transect, focus and perifocal sampling of CTV, CLas, CiLV and their respective vectors. A total of 37700 metadata were generated and stored in a web environment. The flexibility, intuitiveness, operability and effective data management were confirmed at the device resident level, as well as in the virtual data sending in real-time, MS Excel format export, sending via mail and other network modalities. The App-ExploraCítricos v2.0 is registered in the public copyright registry (INDAUTOR) with number 03-2022-022112203600-01.

#### ACKNOWLEDGMENTS

To the CP-LANREF team for the logistical and operational support. To SENASICA and the State Plant Health Committee of Sinaloa for the financing and administrative management for the execution of this project.

#### CITED LITERATURE

- Aanensen DM, Huntley DM, Feil EJ, al-Own FA and Spratt BG. 2009. EpiCollect: Linking smartphones to web applications for epidemiology, ecology and community data collection. *Plos one* 4(9): e6968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006968>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Bassanezi RB, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2017. Diffusion model for describing the regional spread of Huanglongbing from first-reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101:1129-1127. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Acevedo-Sánchez G, Mora-Aguilera G, López-Javier MA y González-Gómez R. 2017. APPS como Herramientas de Soporte Epidemiológico Aplicado a Sistemas Regionales de Vigilancia Epidemiológica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (Suplemento): 184. [https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen352017/VOLUMEN\\_35\\_SUPLEMENTO\\_2017.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen352017/VOLUMEN_35_SUPLEMENTO_2017.pdf)
- Mora-Aguilera G, Martínez-Bustamante V, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras JJ, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Mendoza-Ramos C, Hernández-Nava G,

automatización y robótica, responden a fuertes intereses comerciales y no necesariamente favorecen la visión de la *prevención* sanitaria y la preservación de activos productivos regionales ([https://play.google.com/store/apps/details?id=com.app.syngentasoluciones&hl=es\\_MX&gl=US](https://play.google.com/store/apps/details?id=com.app.syngentasoluciones&hl=es_MX&gl=US); <https://play.google.com/store/apps/details?id=mx.bayer.micultivo&hl=es&gl=US>). La digitalización tecnológica, democrática e incluyente, es un meta acorde con el espíritu humanístico de la agricultura y de la urgente demanda de nuevos paradigmas agrícolas, incluyendo la agricultura de conservación, orgánica, agroecológica, orientados a la sustentabilidad de los recursos ambientales.

#### CONCLUSIONES

El prototipo funcional App ExploraCítricos v2.0 es una innovación digital para la vigilancia integral de plagas cítricas. Su concepción sistémica, estructura modular, y configuración flexible para el muestreo y monitoreo multiplaga acorde a la diversidad regional de los sistemas productivos cítricos le confieren a este desarrollo un gran potencial para uso en la gestión y prevención de riesgos fitosanitarios. App ExploraCítricos fue validada en 58 plantaciones de cítricos agrios y dulces en los estados de San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas en muestreos regionales trasectuales, foco y perifoco de CTV, CLas, CiLV y sus respectivos vectores. Se generaron y almacenaron 37700 metadatos en un entorno web. Se confirmó la flexibilidad, intuitividad, operatividad y gestión efectiva de datos tanto a nivel residente en dispositivo como en envío virtual de datos en tiempo real, exportación en formato MS Excel, envío vía correo y otras modalidades de redes. La App ExploraCítricos v2.0 está inscrita en los registros públicos del derecho de autor (INDAUTOR) con el número de registro 03-2022-022112203600-01.

- Álvarez-Maya I, Gutiérrez-Espinosa MA, Gómez-Linton R, Robles-Bustamante AC, Gallardo-Hernández A. 2022. Surveillance web system and mouthwash-saliva qPCR for labor ambulatory SARS-CoV-2 detection and prevention. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(3):1271. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031271>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, López-Buenfil A, González-Gómez R and Javier-López MA. 2021. Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(3): 452-492. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-6>.
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Santana-Peñalosa B, González-Gómez R, López-Buenfil A, López-Javier M y Carranza P. 2016. Criterios epidemiológicos de accionabilidad regional para control de la roya del café en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34S: 23. [https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Suplemento\\_34\\_2016.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Suplemento_34_2016.pdf)
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez F, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salinas C, Flores-Olivas A, González-Gómez R y Robles-García P. 2014a. Epidemiological surveillance and current status of coconut lethal yellowing, potato purple top and citrus Huanglongbing (HLB) in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 120-131. [https://www.researchgate.net/publication/300533174\\_Epidemiological\\_Surveillance\\_and\\_Current\\_Status\\_of\\_Coconut\\_Lethal\\_Yellowing\\_Potato\\_Purple\\_Top\\_and\\_Citrus\\_Huanglongbing\\_HLB\\_in\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/300533174_Epidemiological_Surveillance_and_Current_Status_of_Coconut_Lethal_Yellowing_Potato_Purple_Top_and_Citrus_Huanglongbing_HLB_in_Mexico)
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge D, Coria-Contreras JJ, Hernández-Hernández E, González-Gómez R, López-Buenfil A, Sánchez-Anguiano H, García-Feria J, Trujillo-Arriaga J, López-Pérez E, Méndez-Ramos A, Matuz-Conde J and Martínez-Bolaños
- AGRADECIMIENTOS**
- Al equipo CP-LANREF por el soporte logístico y operativo. Al SENASICA y Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Sinaloa por el financiamiento y gestión administrativa para la ejecución de este proyecto.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- M. 2014b. Epidemiological surveillance system for coffee rust disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: A regional approach. *In: The 25th International Conference on Coffee Science*. 8-13 Septiembre. Armenia, Colombia. 1-6pp. [https://www.researchgate.net/publication/306347540\\_Epidemiological\\_Surveillance\\_System\\_for\\_Coffee\\_Rust\\_Disease\\_Hemileia\\_vastatrix\\_in\\_Mexico\\_A\\_Regional\\_Approach](https://www.researchgate.net/publication/306347540_Epidemiological_Surveillance_System_for_Coffee_Rust_Disease_Hemileia_vastatrix_in_Mexico_A_Regional_Approach)
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JL, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge D and González-Gómez R. 2014c. Current situation and management perspectives of Citrus HLB. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 108-119. [https://rmf.smf.org.mx/Vol\\_32\\_2\\_2014.html](https://rmf.smf.org.mx/Vol_32_2_2014.html)
- Pethybridge SJ and Nelson SC. 2018. Estimate a new iPad application for assessment of plant disease severity using photographic standard area diagrams. *Plant Disease* 102: 276-281. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1094-SR>
- Pethybridge SJ and Nelson SC. 2015. Leaf Doctor: A new portable application for quantifying plant disease severity. *Plant Disease* 99: 1310-1316. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0319-RE>
- Salcedo BD, Hinojosa R, Mora-Aguilera G, Covarrubias I, De Paolis JRF, Mora S y Cíntora C. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p. <http://repositorio.iica.int/handle/11324/7271>



# *Trichoderma asperellum* Ta13-17 in the growth of *Solanum lycopersicum* and biocontrol of *Corynespora cassiicola*

## *Trichoderma asperellum* Ta13-17 en el crecimiento de *Solanum lycopersicum* y biocontrol de *Corynespora cassiicola*

Sandy Esther Celis-Perera, Jairo Cristóbal-Alejo\*, Arturo Reyes-Ramírez, Rene Garruña-Hernández, José María Tun-Suarez, Tecnológico Nacional de México/ I. T. Conkal. Av. Tecnológico s/n C.P. 97345, Conkal Yucatán, México; Marcela Gamboa-Angulo, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México.

\*Corresponding author: jairoca54@hotmail.com.

Received: July 01, 2022.

Accepted: November 03, 2022.

Celis-Perera SE, Cristóbal-Alejo J, Reyes-Ramírez A, Garruña-Hernández R, Tun-Suarez JM and Gamboa-Angulo M. 2023. *Trichoderma asperellum* Ta13-17 in the growth of *Solanum lycopersicum* and biocontrol of *Corynespora cassiicola*. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 70-81.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-1>

First DOI publication: December 08, 2022.

Primera publicación DOI: 08 de Diciembre, 2022.

**Abstract.** *Corynespora cassiicola* is a pathogen that causes lesions in different organs of tomato crops. For its control, synthetic fungicides are used that require more than one application. *Trichoderma* spp. is a highly interactive saprophytic fungus in the rhizosphere known as a biological control agent against plant diseases and promoter of plant growth due to its different modes of action. The

**Resumen.** *Corynespora cassiicola* es un patógeno que causa lesiones en diferentes órganos en el cultivo de jitomate. Para su control se utiliza fungicidas sintéticos que requieren más de una aplicación. *Trichoderma* spp. es un hongo saprófito, altamente interactivo en la rizosfera conocido por sus modos de acción como agente de control biológico contra enfermedades en plantas y promotor del crecimiento vegetal. Se evaluó el efecto en las variables fisiológicas y de crecimiento en plantas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con las concentraciones de esporas  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  de *Trichoderma asperellum* Ta-13-17 y Fithan® (como testigo comercial) como agente de biocontrol de *C. cassiicola* en condiciones protegidas. Los tratamientos  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y Fithan® obtuvieron las tasas fotosintéticas más altas con 20.7, 20.6 y 19.6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectivamente. El tratamiento  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  obtuvo las medias más altas en las variables de fotosíntesis 20.6  $\mu\text{mol m}^{-2}$

effect on physiological and growth variables in *Solanum lycopersicum* plants inoculated with spore concentrations  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  of *Trichoderma asperellum* Ta-13-17 and Fithan®, (as a commercial control) was evaluated. As a biocontrol agent for *C. cassiicola* under protected conditions. The  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  and Fithan® treatments obtained the highest photosynthetic rates with 20.7, 20.6 and 19.6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectively. The  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment obtained the highest means in the photosynthesis variables 20.6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , yield 1347.02 g per plant and presented a lower percentage of final severity, lower speed in the distribution of the disease and lower accumulation of area under the disease progress curve.

**Keywords:** Antagonist, biological control, photosynthesis, severity.

Tomato is one of the most consumed vegetables worldwide. *Corynespora cassiicola* is a pathogen that attacks tomato plants after the seedling stage, causing lesions on stems, flowers, and fruits. It is distributed in tropical areas, where it causes significant production losses. It is controlled mainly through the use of synthetic fungicides that require several applications during the crop cycle, causing environmental contamination and leading to the emergence of resistant strains (Rodríguez and Sandoval, 1998; Junxiang *et al.*, 2019).

*Trichoderma* spp. is a saprophytic fungus common in ecosystems and highly interactive in root, soil and leaf environments. It is known as a plant growth promoter and as a biological control agent against phytopathogens, an alternative to the use of synthetic fungicides. Its success is due to its mechanisms of action, which include antibiosis, emission of volatile antifungal compounds, production of defense enzymes, systemic resistance,

$\text{s}^{-1}$ , rendimiento 1347.02 g por planta y presentaron menor porcentaje de severidad final, menor velocidad en la distribución de la enfermedad y menor acumulación de área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

**Palabras clave:** Antagonista, control biológico, fotosíntesis, severidad.

El jitomate es una de las hortalizas más consumidas a nivel mundial. *Corynespora cassiicola* es un patógeno que ataca las plantas de jitomate después de la fase de semillero, causa lesiones en tallos, flores y frutos. Se encuentra distribuido en zonas tropicales y su afectación genera importantes pérdidas de producción. Para su control, se utiliza principalmente fungicidas sintéticos que requieren de varias aplicaciones durante el ciclo del cultivo, lo que ocasiona contaminación ambiental y cepas del fitopatógeno resistentes (Rodríguez y Sandoval, 1998; Junxiang *et al.*, 2019).

Por otra parte, *Trichoderma* spp. es un hongo saprófito, común en ecosistemas y altamente interactivo en ambientes de raíces, suelo y hojas. Es conocido como promotor de crecimiento vegetal y como agente de control biológico contra fitopatógenos y es una alternativa para reducir el uso de fungicidas sintéticos. En este contexto, su éxito se debe a sus modos de acción como antibiosis, emisión de compuestos antifúngicos volátiles, producción de enzimas de defensa, resistencia sistémica y micoparasitismo a través de la perforación de la pared celular y la absorción de los nutrientes (Bhat, 2017; Imran *et al.*, 2020; Wonglom *et al.*, 2020; Zin y Badaluddin, 2020). Por otro lado, su capacidad endófito, le confiere relaciones simbióticas e induce la producción de metabolitos bioactivos que regulan con éxito la arquitectura de la raíz y mejora la absorción de nutrientes y el crecimiento en las

and mycoparasitism through cell wall perforation and nutrient absorption (Bhat, 2017; Imran *et al.*, 2020; Wonglom *et al.*, 2020; Zin and Badaluddin, 2020). Its endophytic capacity allows it to establish symbiotic relationships and induces the production of bioactive metabolites that successfully regulate root architecture and improve nutrient absorption and plant growth (Ying-Tzu *et al.*, 2017; Segaran and Sathivelu, 2019).

The present work aimed to evaluate the growth promotion induced by the inoculation of different concentrations of *T. asperellum* Ta13-17 and its effectiveness in the biocontrol of *C. cassiicola*, which causes leaf spot in *S. lycopersicum* plants.

The study was conducted at the National Technological Institute of Mexico, Campus Conkal. The crop was established in a tunnel-type greenhouse between October 2019 and February 2020 with an average minimum temperature of 19 °C and an average maximum temperature of 30 °C. Laboratory evaluations were carried out in the Phytopathology laboratory of the same institute. The native strain *T. asperellum* Ta13-17, which belongs to the strain collection of the Phytopathology laboratory, was used as biostimulant for plant growth and biocontrol, isolated in an endophytic form from the root and stem of chili pepper (*Capsicum annuum*) cv. Creole. The strain was molecularly identified, showing 100% homology and coverage with the reference sequences KC479809.1 and JF501661.1 from the Gene Bank of the National Center For Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The phytopathogen evaluated was *C. cassiicola*. It was inoculated naturally and was molecularly identified in subsequent works (unpublished data) with 100% homology and access number: ON815356 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The model plant was *S. lycopersicum* cv. Hybrid DRD 8551 type saladette, with determined growth, vigorous, resistance to heat and tolerant

plantas (Ying-Tzu *et al.*, 2017; Segaran y Sathivelu, 2019).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la promoción en el crecimiento por la inoculación de concentraciones de *T. asperellum* Ta13-17 y su capacidad en el biocontrol de *C. cassiicola*, causante de la mancha foliar en plantas de *S. lycopersicum*.

El estudio se realizó en el Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal. El cultivo se estableció en un invernadero tipo túnel en los meses de Octubre-2019 a Febrero-2020 con una temperatura mínima promedio de 19 °C y máxima promedio de 30 °C. Las evaluaciones de laboratorio se llevaron a cabo en laboratorio de Fitopatología del mismo instituto. Se utilizó como bioestimulante de crecimiento vegetal y biocontrol la cepa nativa *T. asperellum* Ta13-17 que pertenece a la colección del cepario del laboratorio de Fitopatología, aislada de forma endófito de raíz y tallo de chile (*Capsicum annuum*) cv. Criollo e identificada molecularmente con una homología y cobertura del 100% con las secuencias de referencia KC479809.1 y JF501661.1, del Banco de Genes del National Center For Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). El fitopatógeno evaluado fue *C. cassiicola* inoculado de forma natural, identificado molecularmente en trabajos posteriores (Datos no publicados) con 100 % de homología y número de acceso: ON815356 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Como planta modelo se utilizó a *S. lycopersicum* cv. Híbrido DRD 8551 tipo saladette, de crecimiento determinado, vigoroso, con resistencia en temporadas de calor y tolerante a: virus del rizado amarillo del jitomate (*Tomato yellow leaf curl disease*-TYLCV), virus del mosaico del jitomate (*Tomato mosaic virus*-ToMV), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1, y 2, *Verticillium dahliae*, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Seminis, 2022; <https://n9.cl/brb4j>).

to: tomato yellow leaf curl disease (*Tomato yellow leaf curl disease*-TYLCSV), tomato mosaic virus (*Tomato mosaic virus*-ToMV), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and 2, *Verticillium dahliae*, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* (Seminis, 2022; <https://n9.cl/brb4j>).

A 5 mm disc of mycelium with seven-days growth of *T. asperellum* Ta13-17 was sown in four 500 mL Roux flasks with culture medium of dextrose potato broth for 21 days. The strain presented abundant mycelial growth, cottony, dark green in color, and abundant production of spores. These characteristics are associated with the species under study. After 21 days, the medium was filtered with sterile gauze. The filtrate was placed in 50 mL Falcon tubes and centrifuged three times for 20 minutes at 3,000 rpm. The spores were recovered and used as the mother solution. Dilutions of the stock solution were made until concentrations of  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  were obtained. To corroborate the number of conidia per dilution, 10  $\mu\text{L}$  of each solution were taken and counted in a Neubauer chamber, applying the formula  $\text{NE} = (\text{X}/0.1) (1,000) (9)$ , where NE: No. of spores, X: average of quadrants recorded in the Neubauer camera (Gómez-Ramírez *et al.*, 2013).

To evaluate the promotion of plant growth, tomato seeds were placed in flasks with 30 mL of the corresponding spore solution plus 1 mL of Tween 20, then shaken for 10 min. The seeds were then drained and sown in polystyrene trays with 75 cavities. Two reinforcements of the treatments were applied 15 and 45 days after germination. During the latter, the plants were transplanted in 4 kg plastic bags with sterile soil (120 °C for 15 min). Irrigation was applied with a nutrient solution (20N-20P-20K 1 g  $\text{L}^{-1}$ ). The experiment was maintained under protected conditions and the treatments were applied using a completely randomized experimental design:  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^5$ ,

Se sembró un disco de micelio de 5 mm con siete días de crecimiento de *T. asperellum* Ta13-17 en cuatro frascos Roux de 500 mL con medio de cultivo caldo de papa más dextrosa por 21 días, la cepa presentó un crecimiento micelial abundante, algodonoso en color verde oscuro y abundante producción de esporas; características asociadas a la especie en estudio. Pasado el tiempo, se filtró el medio con una gasa estéril, el filtrado se colocó en tubos Falcón de 50 mL y se centrifugó tres veces por 20 minutos a 3,000 rpm, se recuperaron las esporas y se consideró como la solución madre. Se realizaron diluciones de la solución madre hasta que se obtuvieron las concentraciones  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Para corroborar el número de conidios por dilución, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada solución y se contabilizaron en una cámara Neubauer, y se aplicó la fórmula  $\text{NE} = (\text{X}/0.1) (1,000) (9)$ , donde: NE: No. De esporas, X: promedio de los cuadrantes registrados en la cámara Neubauer (Gómez-Ramírez *et al.*, 2013).

Para evaluar la promoción de crecimiento vegetal se colocaron las semillas de jitomate en matraces con 30 mL de la solución de esporas correspondiente más 1 mL de Tween 20, se agitaron durante 10 min. Después las semillas se escurrieron y se sembraron en charolas de poliestireno de 75 cavidades, se aplicaron dos refuerzos de los tratamientos a los 15 y 45 días después de la germinación, en esta última se realizó el trasplante en bolsas plásticas de 4 kg con suelo estéril (120 °C por 15 min), se dio riego con una solución nutritiva (20N-20P-20K 1 g  $\text{L}^{-1}$ ). El experimento se mantuvo en condiciones protegidas bajo un diseño experimental completamente al azar con los tratamientos:  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  de *T. asperellum* Ta-13-17 y Fithan® (testigo comercial a base de *T. harzianum*, *T. fasciculatum* y *T. viride*). Se consideró 10 repeticiones por tratamiento donde cada planta se tomó como una repetición (Candeleiro *et al.*, 2015).

$1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of *T. asperellum* Ta-13-17 and Fithan® (commercial control based on *T. harzianum*, *T. fasciculatum*, and *T. viride*). Ten repetitions per treatment were used, with each plant taken as a repetition (Candelero *et al.*, 2015).

A SPAD 502 meter (Minolta, Tokyo, Japan) was used to measure the physiological variables 65 days after transplantation (dat) to determine the influence of the *T. asperellum* Ta13-17 strain on the plants. SPAD units were estimated (a quantitative evaluation of the intensity of the green of leaves) and an infrared gas analyzer (LICOR 6400XT, Nebraska, United States) was used to assess the following variables: photosynthesis, stomatal conductance (SC), intercellular carbon (IC), transpiration and water use efficiency (USA). These variables were evaluated 65 days after transplantation. Three plants were taken at random from each treatment; five readings were made per leaf and four leaves were read per plant (Garraña-Hernández *et al.*, 2014).

At the end of the experiment (130 days after sowing), a destructive sampling was carried out, taking 10 plants per treatment. Plant height (PH) and stem diameter (SD) were measured. The displacement method was used to estimate root volume (VR). The dry weight of each organ (leaves, stem and root) and the partial dry weight of plants were measured in plants dried in a convection oven for 96 hours at 60 °C. Normality tests were performed on the data, giving a p-value <0.0001. An analysis of variance was performed and a comparison of means was performed using Tukey's method ( $p \leq 0.05$ ).

At 80 dat, the presence of *C. cassiicola* was detected naturally in the culture. The biocontrol effect of *T. asperellum* Ta13-17 was estimated by measuring the severity of the disease using a six-class scale where: 1=1%, 2= 5%, 3=10%, 4=20%

Se midieron variables fisiológicas a los 65 días después del trasplante (ddt) para determinar la influencia de la cepa de *T. asperellum* Ta13-17 en las plantas, con un SPAD 502 (Minolta, Tokio, Japón) se estimaron las unidades SPAD (evalúa cuantitativamente la intensidad del verde de la hoja) y con un analizador de gases en infrarrojo (LICOR 6400XT, Nebraska, Estados Unidos) se estimaron: fotosíntesis, conductancia estomática (CE), carbono intercelular (CI), transpiración y eficiencia del uso de agua (EUA), estas variables fueron evaluadas a los 65 días después del trasplante, se tomaron tres plantas al azar de cada tratamiento y se realizaron cinco lecturas por hoja y cuatro hojas por planta (Garraña-Hernández *et al.*, 2014).

Al final del experimento (130 días después de la siembra) se realizó un muestreo destructivo, se tomaron las 10 plantas por tratamiento, se midió altura de planta (AP), diámetro del tallo (DT), por el método de desplazamiento se estimó el volumen de raíz (VR), el peso seco por órgano (hojas, tallo y raíz) y el peso seco parcial que se contabilizó en plantas secadas en un horno de convección durante 96 horas a 60 °C. Se realizaron pruebas de normalidad a los datos dando un p-valor <0.0001, análisis de varianza y la prueba de comparación de medias por el método de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

A los 80 ddt se detectó de manera natural la presencia *C. cassiicola* en el cultivo, el biocontrol por *T. asperellum* Ta13-17 se estimó con la medición de la severidad mediante una escala de seis clases donde: 1=1 %, 2=5 %, 3=10 %, 4=20 % y 5=40 % y 6=60 % o más de daño (Costa *et al.*, 2015). Se hicieron tres evaluaciones a los 80, 90 y 100 ddt. Con los datos de severidad, se construyeron curvas del progreso de la enfermedad y se estimaron mediante modelos epidemiológicos la intensidad de la enfermedad: área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), mediante el método de integración trapezoidal y la tasa de infección aparente



and 5=40% and 6=60% or more damage (Costa *et al.*, 2015). Three evaluations were made at 80, 90 and 100 dat. With the severity data, disease progress curves were constructed, and the intensity of the disease was estimated using epidemiological models. The area under the disease progress curve (AUDPC) was built using the trapezoidal integration method. The apparent infection rate was estimated using the inverse parameter of  $b$  ( $1/b$ ) from the Weibull model. The final severity was calculated using  $Y_{\text{final}}$  (Mejía-Bautista *et al.*, 2016).

The analysis of variance showed significant differences between treatments for the SPAD variable. The highest average of SPAD units (40.3) was estimated in the treatment inoculated with *T. asperellum* Ta13-17 at a concentration of  $1 \times 10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . The control treatment showed 37.8, which indicated a higher concentration of nitrogen in the leaves of these treatments (Table 1). The values of SPAD units found in the present study were lower than those reported by Mendoza *et al.* (1998) without the incorporation of fungal inoculants.

mediante el parámetro inverso de  $b$  ( $1/b$ ) del modelo Weibull, se calculó la severidad final, mediante  $Y_{\text{final}}$  (Mejía-Bautista *et al.*, 2016).

El análisis de varianza, mostró diferencias significativas entre tratamientos para la variable de unidades SPAD, en el tratamiento inoculado con *T. asperellum* Ta13-17 en la concentración  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  se estimó el mayor promedio (40.3) al igual que el testigo con 37.8, lo que indicó mayor concentración de nitrógeno presente en las hojas de estos tratamientos (Cuadro 1). Los valores de unidades SPAD en este estudio, fueron inferiores a los reportadas por Mendoza *et al.* (1998), sin la incorporación de inoculantes fúngicos.

No hubo una relación entre las unidades SPAD y la fotosíntesis donde los tratamientos  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y Fithan® obtuvieron las tasas fotosintéticas más altas con 2.8, 2.7 y  $1.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mayores al testigo, en su orden. El tratamiento Fithan® presentó la mayor conductancia estomática, se relacionó su actividad fotosintética al estimar mayor captación de  $\text{CO}_2$ , sin embargo, presentó mayor acumulación de carbono intercelular con  $323.4 \mu\text{mol mol}^{-1}$  al igual que el testigo sin inoculante fúngico,

**Table 1. Physiological variables of DRD 8551 hybrid tomato plants inoculated with the Ta13-17 strain of *T. asperellum* 13-17.**

**Cuadro 1. Variables fisiológicas de plantas de jitomate híbrido DRD 8551 inoculadas con la cepa Ta13-17 de *T. asperellum*.**

| Tratamiento     | Unidades SPAD | Fotosíntesis $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | CE $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | CI $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | Transpiración $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | UEA $\mu\text{mol CO}_2 \text{mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ |
|-----------------|---------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| $1 \times 10^5$ | 40.3±0.56 a   | 17.5±0.29 c                                       | 0.66±0.02 d                          | 310.2±1.60 b                | 11.5±0.15 d                                      | 1.5±0.03 bc                                                  |
| $1 \times 10^6$ | 36.4±0.80 b   | 20.7±0.41 a                                       | 0.86±0.03 bc                         | 309.4±1.84 b                | 13.2±0.16 a                                      | 1.5±0.04 bc                                                  |
| $1 \times 10^7$ | 29.9±0.61 c   | 18.7±0.37 bc                                      | 0.80±0.04 c                          | 314.4±0.61 b                | 12.7±0.12 bc                                     | 1.4±0.02 c                                                   |
| $1 \times 10^8$ | 34.8±0.78 b   | 20.6±0.43 a                                       | 0.91±0.01 b                          | 313.7± 0.98 b               | 12.9±0.10 ab                                     | 1.6±0.02 b                                                   |
| Fithan          | 37.3±1.08 b   | 19.6±0.08 ab                                      | 1.07±0.02 a                          | 323.4±0.82 a                | 12.4±0.03 c                                      | 1.5±0.01 bc                                                  |
| Testigo         | 37.8±0.51 ab  | 17.9±0.36 c                                       | 0.88±0.02 bc                         | 324.7±1.37 a                | 10.0±0.06 e                                      | 1.7±0.04 a                                                   |

Los valores son medias  $\pm$  EE; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $n = 10$ . CE: Conductancia estomática, CI: Carbono intercelular, UEA: Uso eficiente de agua. / Los valores son medias  $\pm$  EE; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $n = 10$ . CE: Conductancia estomática, CI: Carbono intercelular, UEA: Uso eficiente de agua.

There was no relationship between SPAD units and photosynthesis. The treatments with  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  and Fithan® obtained the highest photosynthetic rates with 2.8, 2.7 and 1.7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectively, higher than the control. The Fithan® treatment showed the highest stomatal conductance, which was associated with its photosynthetic activity. A greater  $\text{CO}_2$  uptake was estimated; however, there was also a greater accumulation of intercellular carbon with 323.4  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , as in the control treatment without fungal inoculant. This indicated that the Fithan® treatment had low photosynthetic activity (Table 1), which means that the carbon molecules in the intercellular spaces were not efficiently assimilated and started to accumulate. The control treatment had the lowest transpiration value, which is associated with better efficiency in the use of water. This suggests a stable relationship between stomatal opening and transpiration in this treatment.

The highest transpiration values were found in treatments  $1 \times 10^6$  ( $13.2 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and  $1 \times 10^8$  ( $12.9 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). This means that a greater content of water was lost for each molecule of  $\text{CO}_2$  that was fixed for the photosynthesis process. The treatments of the plants inoculated with *T. asperellum* Ta 13-17 presented lower efficiency in the use of water. Studying wheat plants inoculated from the seed with *Trichoderma* spp., Mulu *et al.* (2020) reported increased photosynthesis, decreased stomatal conductance, intercellular  $\text{CO}_2$  and transpiration, which improved water use efficiency under salt stress conditions.

There were no statistical differences between treatments with respect to plant height and root dry weight. The  $1 \times 10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment had the highest biomass production in leaves, as indicated by having the highest average dry weight of this organ, statistically equal to the  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment, 45.9 and 30.1 g higher values,

lo que indicó baja actividad fotosintética en este tratamiento (Cuadro 1), en este contexto con una actividad de fotosíntesis baja; las moléculas de carbono en los espacios intercelulares, no son asimilados con eficiencia lo que genera su acumulación. El testigo presentó el valor más bajo en transpiración, lo que causó mejor eficiencia en el uso de agua, esto sugiere una relación estable entre la apertura estomática y la transpiración en las plantas de este tratamiento.

La mayor transpiración se encontró en los tratamientos  $1 \times 10^6$  ( $13.2 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y  $1 \times 10^8$  ( $12.9 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) es decir, se perdió mayor contenido de agua por cada molécula de  $\text{CO}_2$  que logró fijar para el proceso de fotosíntesis. Los tratamientos en las plantas inoculadas con *T. asperellum* Ta 13-17 presentaron menor eficiencia en el uso de agua. Mulu *et al.* (2020) en plantas de trigo, inoculadas desde semilla con *Trichoderma* spp. reportaron aumento en la fotosíntesis, disminución de la conductancia estomática,  $\text{CO}_2$  intercelular y transpiración, lo que mejoró la eficiencia en el uso del agua bajo condiciones de estrés salino.

No se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos con respecto a la altura de planta y peso seco de raíz. El tratamiento  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  acumuló la mayor producción de biomasa en hojas reflejado en la media más alta en el peso seco de este órgano, estadísticamente igual al tratamiento  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  con 45.9 y 30.1 g más que las plantas del tratamiento Fithan que presentó el menor peso seco de hojas. En relación al peso seco del tallo, los tratamientos fueron estadísticamente iguales a excepción del  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  que presentó el menor peso seco. El tratamiento  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , obtuvo la media más alta en el peso seco con 47.2 g más que el tratamiento Fithan, estadísticamente  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  fue igual a los tratamientos  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y al testigo sin inoculante fúngico. La mayor producción de frutos se obtuvo

respectively, than the values obtained with the Fithan® treatment plants, which had the lowest dry weight of leaves. Regarding the dry weight of the stem, the treatments were statistically equal except for the  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment, which had the lowest dry weight of the stem. The  $1 \times 10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment obtained the highest mean dry weight, 47.2 g higher than the Fithan® treatment. Statistically, the  $1 \times 10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment was equal to the  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  treatments, as well as to the control treatment without fungal inoculant. The highest fruit production was obtained with the  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment with 1347.0 g per plant, 259.4 g higher than the control treatment without the presence of *T. asperellum* Ta13-17. This result was statistically equal to the  $1 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  treatment (Table 2).

Cetz-Chi *et al.* (2018) reported increases in the growth of tomato plants, with height gains between 4.4 and 14.2% when inoculated with the native species *T. virens* (Th33-59 and Th26-52) and *T. simmonsii* (Th33-58). The Th33-59 strain of *T. virens* increased root volume and root dry weight with respect to the control. Ruiz-Cisneros *et al.* (2018) observed increases in plant height, stem diameter, and root length in tomato plants

con el tratamiento  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  con 1347.0 g por planta, 259.4 g superior al testigo sin la presencia de *T. asperellum* Ta13-17. Este resultado fue estadísticamente igual al tratamiento  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  (Cuadro 2).

Cetz-Chi *et al.* (2018) reportaron incrementos en el crecimiento de plantas de jitomate, con ganancias de altura entre 4.4 y 14.2 % cuando se inocularon con especies nativas: *T. virens* (Th33-59 y Th26-52) y *T. simmonsii* (Th33-58), Th33-59 de *T. virens* incrementó el volumen radical y el peso seco de raíz con respecto al testigo. Ruiz-Cisneros *et al.* (2018) observaron incrementos en altura de planta, diámetro de tallo y longitud de raíz en plantas de jitomate cuando se inocularon con *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* en concentraciones de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Márquez-Benavidez *et al.* (2017) indicaron incrementos en la longitud radical en plántula y mayor producción de biomasa fresca de hojas y raíz en etapa de floración en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *T. harzianum*.

El éxito en la promoción de crecimiento en plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. se asocia con la relación simbiótica; *Trichoderma* aprovecha compuestos producidos por las plantas como carbohidratos, ácidos orgánicos y vitaminas, mientras

**Table 2. Growth in hybrid tomato plants DRD 8551 inoculated with the Ta13-17 strain of *T. asperellum* 13-17.**  
**Cuadro 2. Crecimiento en plantas de jitomate híbrido DRD 8551 inoculadas con la cepa Ta13-17 de *T. asperellum*.**

| Tratamientos    | AP (cm)       | PSH (g)       | PST (g)      | PSR (g)     | PSParcial (g) | Rendimiento (g/planta) |
|-----------------|---------------|---------------|--------------|-------------|---------------|------------------------|
| $1 \times 10^5$ | 224.6±5.75 a  | 78.3±4.40 a   | 37.1±7.14 ab | 11.1±4.67 a | 126.5±10.0 a  | 918.0±70.90 bc         |
| $1 \times 10^6$ | 211.2±14.19 a | 62.5±10.93 ab | 29.6±2.99 b  | 7.2±1.64 a  | 99.3±13.47 ab | 914.5±84.93 bc         |
| $1 \times 10^7$ | 203.0±6.27 a  | 45.3±4.91 bc  | 42.4±2.75 ab | 6.7±0.49 a  | 94.4±6.52 ab  | 1160.8±49.36 ab        |
| $1 \times 10^8$ | 220.2±4.68 a  | 48.9±2.82 bc  | 31.1±1.05 ab | 7.1±0.54 a  | 86.7±3.34 b   | 1347.0±64.93 a         |
| Fithan          | 217.6±8.01 a  | 32.4±2.42 c   | 40.4±4.63 ab | 6.1±0.83 a  | 79.3±3.78 b   | 783.1±26.41 c          |
| Testigo         | 204.4±8.85 a  | 47.4±7.17 bc  | 47.9±2.84 a  | 5.4±0.57 a  | 100.8±8.34 ab | 901.4±26.41 bc         |

Los valores son medias ± EE; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $n = 10$ . AP: Altura de planta, PSH: Peso seco de hojas, PST: Peso seco de tallo, PSR: Peso seco de raíz, PSParcial: Peso seco parcial y VR: Volumen de raíz. / Los valores son medias ± EE; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $n = 10$ . AP: Altura de planta, PSH: Peso seco de hojas, PST: Peso seco de tallo, PSR: Peso seco de raíz, PSParcial: Peso seco parcial y VR: Volumen de raíz.

inoculated with *T. asperellum*, *T. harzianum*, and *T. longibrachiatum* at concentrations of  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . Marquez-Benavidez *et al.* (2017) reported increases in root length in seedlings and greater production of fresh biomass of leaves and roots in the flowering stage of *Phaseolus vulgaris* plants inoculated with *T. harzianum*.

The success in promoting growth in plants by inoculating them with *Trichoderma* spp. is associated with the symbiotic relationship. *Trichoderma* takes advantage of compounds produced by plants such as carbohydrates, organic acids and vitamins, while plants use phytohormones and secondary metabolites secreted by fungi, which also facilitate the decomposition and mineralization of organic matter and improve the availability of nutrients in the soil (Ortiz -Castro *et al.*, 2009). Other mechanisms that promote plant growth activity are the ability of *Trichoderma* to produce indoleacetic acid, which acts as a catalyst for primary meristematic tissues and the activation of plant plasma membrane enzymes that promote cell growth and division as well as plant growth (Moo-Koh *et al.*, 2017; González-Marquetti *et al.*, 2019).

Some *Trichoderma* isolates can solubilize nutrients close to the roots, which allows these substances to be assimilated by the plant. It has been suggested that *T. asperellum* enhances the uptake of Fe in deficient environments. Moreover, the protein QID74 present in the cell wall modifies the root architecture, increases the total absorption surface and the translocation of nutrients in the shoots, resulting in an increase in biomass through an efficient use of N, P, K and micronutrients (Zhao *et al.*, 2014; González-Marquetti *et al.*, 2019).

The Fithan® treatments and the control treatment without fungal inoculant presented the highest rates of disease progress, with 0.0082 and 0.0085% per day. They also presented higher AUCPE and higher

que las plantas utilizan fitohormonas y metabolitos secundarios secretados por los hongos, además, facilitan la descomposición y mineralización de materia orgánica y mejoran la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Otros mecanismos que promueven la actividad de crecimiento en las plantas, son la capacidad de *Trichoderma* para producir ácido indolacético, que actúa como catalizador de tejidos meristemáticos primarios y la activación de enzimas de la membrana plasmática de las plantas, que favorecen el crecimiento y la división celular y promueve el crecimiento de la planta (Moo-Koh *et al.*, 2017; González-Marquetti *et al.*, 2019).

Algunos aislados de *Trichoderma* pueden solubilizar nutrientes cercanos a las raíces, lo que permite que estas sustancias puedan ser asimiladas por la planta. Se ha sugerido que *T. asperellum* mejora la absorción de Fe en ambientes deficientes. Además, la proteína QID74 presente en la pared celular modifica la arquitectura de la raíz, aumenta la superficie de absorción total y la translocación de nutrientes en los brotes, lo que resulta en un aumento de la biomasa a través de un uso eficiente de N, P, K y micronutrientes (Zhao *et al.*, 2014; González-Marquetti *et al.*, 2019).

Los tratamientos Fithan® y el testigo sin inoculante fúngico, presentaron las mayores tasas de infección aparente del progreso de la enfermedad con 0.0082 y 0.0085 % por día, también, presentaron mayor ABCPE y mayor porcentaje de severidad final. La enfermedad disminuyó en las plantas del tratamiento  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  con 0.0078 unidad % por día. Estadísticamente, los tratamientos inoculados con *T. asperellum* Ta13-17 fueron iguales en menor acumulación de ABCPE en el tiempo evaluado, el tratamiento  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  presentó la menor ABCPE con 275.8 Unidad % día<sup>-1</sup> menos que el testigo sin inoculante fúngico y una severidad final de 18.74 % menor al testigo indicado (Cuadro 3).

percentages of final severity. The disease decreased in plants treated with  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  with 0.0078 unit% per day. Statistically, the treatments inoculated with *T. asperellum* Ta13-17 showed an equally low accumulation of AUCPE during the evaluation time. The treatment with  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  presented the lowest AUCPE with 275.8 unit%  $\text{day}^{-1}$ , less than the control treatment without fungal inoculant. The final severity was 18.74% lower than the control (Table 3).

Baiyee *et al.* (2019) reported a significant decrease in the severity of leaf spot disease caused by *C. cassiicola* and *C. aeria* in lettuce plants inoculated with *T. asperellum* T1. Wonglom *et al.* (2020) attributed resistance against *C. cassiicola* and *C. aeria* to volatile organic compounds emitted by *T. asperellum* T1.

Antagonistic microorganisms in association with plants reduce the severity of the disease by inducing responses that are triggered by the production of defense-related enzymes and enzymes that hydrolyze the cell wall (Baiyee *et al.*, 2019).

Baiyee *et al.* (2019) reportaron con la inoculación de *T. asperellum* T1 una disminución significativa en la severidad de la enfermedad de la mancha foliar causada por *C. cassiicola* y *C. aeria* en plantas de lechuga. Por su parte Wonglom *et al.* (2020) atribuyeron la resistencia contra *C. cassiicola* y *C. aeria* a los compuestos orgánicos volátiles emitidos por la cepa T1 de *T. asperellum*.

Los microorganismos antagonistas en asociación con las plantas reducen la severidad de la enfermedad, al inducir respuestas que se desencadenan con la producción de enzimas relacionadas con la defensa y enzimas que hidrolizan la pared celular (Baiyee *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

La concentración de  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  *T. asperellum* Ta13-17 presentó los mejores efectos positivos en las variables fisiológicas y de crecimiento en plantas de jitomate, ya que mejoró la actividad fotosintética y el rendimiento del cultivo. Además,

**Table 3. Epidemiological parameters to estimate the control of *C. cassiicola* in hybrid tomato plants DRD 8551 inoculated with *T. asperellum* Ta13-17.**

**Cuadro 3. Parámetros epidemiológicos para estimar el control de *C. cassiicola* en plantas de jitomate híbrido DRD 8551 inoculadas con *T. asperellum* Ta13-17.**

| Tratamiento         | Weibull (Tasa de infección aparente (1/b)) % día | r <sup>2</sup> ajuste del modelo | ABCPE (Unidad % día <sup>-1</sup> ) | Y <sub>Final</sub> (%) |
|---------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 1 x 10 <sup>5</sup> | 0.0016±0.0 c                                     | 0.974                            | 141.4±0.29 b                        | 2.2±0.09 b             |
| 1 x 10 <sup>6</sup> | 0.0070±0.0 b                                     | 0.964                            | 185.8±0.35 b                        | 8.5±0.50 b             |
| 1 x 10 <sup>7</sup> | 0.0019±0.0 c                                     | 0.989                            | 105.1±0.20 b                        | 1.4±0.13 b             |
| 1 x 10 <sup>8</sup> | 0.0007±0.0 d                                     | 0.956                            | 86.1±0.07 b                         | 1.2±0.05 b             |
| Fithan              | 0.0082±0.0 a                                     | 0.922                            | 359.6±0.47 a                        | 21.9±0.91 a            |
| Testigo             | 0.0085±0.0 a                                     | 0.959                            | 361.9±0.52 a                        | 19.7±0.29 a            |

Los valores son medias ± EE; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $n = 10$ , ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad, Y<sub>final</sub>: severidad final. / Los valores son medias ± EE; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $n = 10$ , ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad, Y<sub>final</sub>: severidad final.



## CONCLUSIONS

The concentration of  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of *T. asperellum* Ta13-17 presented the best positive effects on the physiological and growth variables of tomato plants. This concentration improved photosynthetic activity and crop yield. Moreover, it improved the resistance of the plants by reducing the progress of the disease and the final severity of the fungus infection.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the National Technological Institute of Mexico/Conkal Campus and the National Council for Science and Research (CONACYT), as well as to the researchers who were part of this work.

## CITED LITERATURE

- Bhat KA. 2017. A new agar plate assisted slide culture technique to study mycoparasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6: 3176–3180. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.608.378>
- Baiyee B, Itod S and Sunpapao A. 2019. *Trichoderma asperellum* T1 mediated antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology 106: 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.12.009>
- Cetz-Chi JI, Cristóbal AJ, Tún SJ, Peraza LF y Candelero de la CJ. 2018. Especies nativas de *Trichoderma* spp. y su actividad antagonica contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum* L. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes 26(73): 5-12. <https://doi.org/10.33064/iycuaa201873136>
- Candelero CJ, Cristóbal, AJ, Reyes, RA, Tun, SJ, Gamboa, AM y Ruiz SE. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. Revista Internacional de Botánica Experimental FYTON 84: 113-119. [https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/519/1/2015\\_AI\\_id37069\\_Marcela\\_Gamboa.pdf](https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/519/1/2015_AI_id37069_Marcela_Gamboa.pdf)
- Costa LD, Marouelli WA, Duarte H da SS and Café-Filho AC. 2015. Standard area diagrams for assessment of powdery mildew severity on tomato leaves and leaflets.

mejoró la resistencia de las plantas al disminuir el progreso de la enfermedad y la severidad final del hongo fitopatogéno.

## AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México/Campus Conkal y al Concejo Nacional de Ciencia e Investigación (CONACYT), así como como a los investigadores que formaron parte de este trabajo.

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

- Crop Protection 67: 26-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.014>
- Garruña-Hernández R, Latournerie-Moreno L, Ayala-Garay O, Santamaría JM y Pinzón-López L 2014. Acondicionamiento pre-siembrado: una opción para incrementar la germinación de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Agrociencia 48: 413-423. 2014. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952014000400006
- González-Marquetti I, Infante MD, Arias VY, Gorrita RS, Hernández GT, Noval PB, Martínez CB y Peteira B. 2019. Efecto de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt and Nirenberg sobre indicadores de crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar BAT-304. Revista de Protección Vegetal 34(2): 2224-4697. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522019000200004
- Gómez-Ramírez SE, Gilchrist-Ramelli E y Reynaldi S. 2013. Importancia del aislamiento y del rango de concentración de conidias en el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre el crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* L. Revista Colombiana de Biotecnología 15(1): 118-125. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752013000100012&script=sci_abstract&tlng=es
- Imran A, Arif M, Shah Z and Bari A. 2020. Soil application of *Trichoderma* and peach (*Prunus persica* L.) residues possesses biocontrol potential for weeds and enhances growth and profitability of soybean (*Glycine max*). Sarhad Journal of Agriculture 36(1): 10-20. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2020/36.1.10.20>
- Junxiang L, Hong N, Peng B, Wu H and Gu Q. 2019. Transformation of *Corynespora cassiicola* by *Agrobacterium tumefaciens*. Fungal Biology 123: 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.011>

- Márquez-Benavidez L, Rizo LM, Montaña AN, Ruiz NN y Sánchez YJ. 2017. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación de diferentes dosis de *Trichoderma harzianum* con el fertilizante nitrogenado reducido al 50%. Journal of the Selva Andina Research Society 8(2): 125-134. <http://dx.doi.org/10.36610/j.jsars.2017.080200135>
- Mendoza RM, Alcántar GG, Aguilar SA, Etchevers BJ y Santizó RJ. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra Latinoamericana 16(2): 135-141. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316204>
- Mejía-Bautista M, Reyes RA, Cristóbal AJ, Tun SJ, Borges GL y Pacheco AJ. 2016. *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. Revista Mexicana de Fitopatología 34(3): 208-222. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1603-1
- Mulu OA, Hussain T, Waghmode T, Zhao H, Sun H, Xiaojing L, Xinzhen W and Binbin L. 2020. *Trichoderma* Enhances Net Photosynthesis, Water Use Efficiency, and Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Salt Stress. Microorganisms 8:1565. doi:10.3390/microorganisms8101565
- Moo-Koh F, Cristóbal AJ, Reyes RA, Tun SJ y Gamboa AM. 2017. Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* spp. y su actividad promotora en *Solanum lycopersicum* L. Investigación y Ciencia 25(71): 5-11. <https://www.redalyc.org/journal/674/67452917001/html/>
- Ortiz-Castro R, Contreras CA, Macías RL and López BJ. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. Plant Signaling & Behavior 4(8): 701-712. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>
- Rodríguez F y Sandoval I. 1998. Efectividad de diferentes productos químicos y el biopreparado de *Trichoderma harzianum* (Rifai) contra enfermedades fúngicas del tomate de hidropónico. Fitosanidad 2(1): 1-6. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2003100496>
- Ruiz-Cisneros MF, Ornelas PJ, Olivás OG, Acosta MC, Sepúlveda AD, Pérez CD, Ríos, VC, Salas MM and Fernández PS. 2018. Effect of *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. Revista Mexicana de Fitopatología 36(3): 444-456. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1804-5>
- Segaran G and Sathiavelu M. 2019. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 21: 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2019.101284>
- Wonglom P, Shin-ichi I and Sunpapao A. 2020. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). Fungal Ecology 43: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100867>
- Ying-Tzu L, San-Gwang H, Yuh-Ming H and Cheng-Hua H. 2017. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. Crop Protection 30:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>
- Zhao L, Wang F, Zhang Y and Zhang J. 2014. Involvement of *Trichoderma asperellum* strain T6 in regulating iron acquisition in plants. Journal of Basic Microbiology 54: S115-S124. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63415-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63415-3)
- Zin N A and Badaluddin NA 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences 65:168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>

Mixture of clove (*Syzygium aromaticum*) and garlic (*Allium sativum*) alcoholic extracts in the control of black Sigatoka in 'Macho' plantain

Mezcla de extracto alcohólico de clavo (*Syzygium aromaticum*) y ajo (*Allium sativum*) en el control de la Sigatoka negra en plátano 'Macho'

María de Lourdes Adriano-Anaya, Sandra Matías-Castillo, Benjamín Moreno-Castillo, Alfredo Vázquez-Ovando, Miguel Salvador-Figueroa*, Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino S/N Col. Solidaridad 2000, Tapachula Chiapas, CP. 30798, México.

*Corresponding author: miguel.salvador@unach.mx.

Received: July 04, 2022.

Accepted: December 14, 2022.

Adriano-Anaya MdeL, Matías-Castillo S, Moreno-Castillo B, Vázquez-Ovando A and Salvador-Figueroa M. 2023. Mixture of clove (*Syzygium aromaticum*) and garlic (*Allium sativum*) alcoholic extracts in the control of black Sigatoka in 'Macho' plantain. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 82-92.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-3>

First DOI publication: December 24, 2022.

Primera publicación DOI: 24 de Diciembre, 2022.

Abstract. The incidence and severity of the Black Sigatoka (BS) was assessed in plantain plants "Macho" variety, sprayed with a mixture of alcoholic extracts of clove ($36 \mu\text{g}_{\text{clove}} \text{mL}^{-1}$) and garlic ($150 \mu\text{g}_{\text{garlic}} \text{mL}^{-1}$) under field conditions. Three treatments were evaluated: foliar application every 7 days (T1), every 14 days (T2) and without extracts or control (T3). Initially, the experimental

Resumen. Bajo condiciones de campo se evaluó la incidencia y severidad de Sigatoka Negra (SN) en plátano 'Macho', asperjado con la mezcla del extracto alcohólico de clavo ($36 \mu\text{g}_{\text{clavo}} \text{mL}^{-1}$) – ajo ($150 \mu\text{g}_{\text{ajo}} \text{mL}^{-1}$). Tres tratamientos fueron establecidos: aplicación cada 7 días (T1), cada 14 días (T2) y sin mezcla o control (T3). Las plantas utilizadas tenían 3 meses de edad y el trabajo concluyó, posteriormente, a los 238 días. La incidencia y severidad de la SN, el número total de hojas, la hoja más joven sin SN y el tiempo a florecimiento se determinaron cada 14 día. En relación al T3, las plantas del T1 tuvieron 20.5 y 25.3% menos incidencia y severidad de SN y, las del T2, 11.4 y 22.6% menos. El número de hojas totales fue 9.3, 8.8 y 8.5 y la hoja más joven con SN fue 7.2, 6.4 y 5.6 para T1, T2 y T3, respectivamente. Los días a florecimiento fueron 140 para T1 y 182 para T2. Los resultados muestran el potencial de la mezcla de los extractos alcohólicos de ajo y clavo como alternativa para el control de la SN.

plants were 3 months-old and the experiment concluded 238 days later. Every 14 days the incidence and severity of BS, the total number of leaves, the youngest leaf without symptoms and the time to flowering were measured. In relation to the plants of T3, the weighted average incidence and severity of BS were lower by 20.5 and 25.3% for T1 and 11.4 and 22.6% for T2, respectively. The average of total leaves was, 9.3, 8.8 and 8.5 and the youngest leaf with disease symptoms were 7.2, 6.4 and 5.6 for T1, T2 and T3, respectively. The days to flowering after the beginning of the experiment were 140 for T1 and 182 for T2. The results show the potential of using the alcoholic extracts of garlic and clove as an alternative for the control of the BS.

Keywords. *Pseudocercospora fijiensis*, incidence, severity, plant extracts.

Black Sigatoka (BS) is a disease caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis*. It is present in plantain and banana plantations around the world and can cause the total loss of the crop (Marín *et al.*, 2003). The reduction of the photosynthetic area is the reason why *P. fijiensis* is so harmful (Hidalgo *et al.*, 2006).

Conventional control of BS is based on cultural practices and the application of chemical fungicides. The first consists, primarily, in periodically cutting the parts of the leaves with presence of advanced lesions of the disease, finally removing the whole leaf. The second is carried out through the alternate application of protective and systemic fungicides, which can also be applied together in a mixture (Orozco-Santos *et al.*, 2008). These fungicides, although effective, contaminate the environment (Geissen *et al.*, 2010) and are used with increasing frequency (Martínez and Guzmán, 2010). For the

Palabras clave: *Pseudocercospora fijiensis*, incidencia, severidad, extractos de plantas.

La Sigatoka Negra (SN) es una enfermedad provocada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*. Esta enfermedad está presente en las plantaciones de plátano y banano de todo el mundo y puede causar la pérdida total de la cosecha (Marín *et al.*, 2003). La reducción del área fotosintética es la razón por la cual *P. fijiensis* resulta tan dañino (Hidalgo *et al.*, 2006).

El control convencional de la SN se basa en prácticas culturales y en la aplicación de fungicidas químicos. La primera consiste, primordialmente, en cortar periódicamente las secciones de hojas con presencia de lesiones avanzadas de la enfermedad, concluyendo con la eliminación total de la hoja. La segunda se realiza mediante la aplicación alternativa, o en mezcla, de fungicidas protectores y sistémicos (Orozco-Santos *et al.*, 2008). Estos últimos, aunque eficaces, son contaminantes del ambiente (Geissen *et al.*, 2010) y cada vez se utilizan con más frecuencia (Martínez y Guzmán, 2010). Por esta última razón el control de SN representa entre el 35 - 45% del costo de producción del fruto (Garrido-Ramírez *et al.*, 2011).

Una alternativa de control de SN es el uso de productos biológicos, entre los que se encuentran tanto microorganismos antagonistas y sus metabolitos, como extractos de plantas (Okigbo y Emoghene, 2003). En laboratorio, los extractos de *Commelina diffusa* (canutillo), *Momordica charantia* (melón amargo), *Pavonia* spp. (flor de tigre), *Ple-nax* sp., *Piper hispidum* (cigarrillo), *Pelargonium peltatum* (geranio hiedra), *Sida rhombifolia* (escobilla), *Syzygium aromaticum* (clavo) y *Topobea discolor* (amarraboy), inhibieron la germinación de esporas y el crecimiento de la colonia de *P. fijiensis* (Mosquera *et al.*, 2009; Riveros y Arciniegas, 2003).

latter reason, the control of BS represents between 35-45% of the production cost of plantains and bananas (Garrido-Ramírez *et al.*, 2011).

An alternative method of BS control is the use of biological products, including antagonistic microorganisms and their metabolites, as well as plant extracts (Okigbo and Emoghene, 2003). In the laboratory, extracts from *Commelina diffusa* (canutillo), *Momordica charantia* (bitter melon), *Pavonia* spp. (tiger flower), *Plenax* sp., *Piper hispidum* (cofalillo), *Pelargonium peltatum* (ivy geranium), *Sida rhombifolia* (arrowleaf sida), *Syzygium aromaticum* (clove), and *Topobea discolor* (amarraboyo) inhibited the germination of spores and the colony growth of *P. fijiensis* (Mosquera *et al.*, 2009; Riveros and Arciniegas, 2003).

Under shade house conditions, Vargas *et al.* (2009) evaluated the ethanolic extracts of leaves of *Heliotropium indicum* (Indian heliotrope), *Lippia origanoides* (Mexican oregano), *Ricinus communis* (castor bean), and their combinations, in three-month-old “Harton” plantain plants infected with *P. fijiensis*. They found that the lowest weighted average incidence of the infection, and the highest position of the youngest diseased leaf were obtained with *H. indicum* + *R. communis*, while the highest total number of leaves was obtained with the treatment with *H. indicum* + *L. origanoides* + *R. communis*. In three-months-old “Gran Enano” banana clone inoculated with conidia of *P. fijiensis*, Morales *et al.* (2011) found that spraying every 15 days the aqueous extracts of cundeamor (*Motorbike charantia*), sage (*Salvia officinalis*), and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) yielded a similar response to treatment with Mancozeb.

Likewise, the combination of alcoholic extracts of clove (*S. aromaticum*) and garlic (*Allium sativum*), in concentrations of 36 µg mL⁻¹ and 150 µg mL⁻¹, respectively, reduced the colony growth

A escala de casa sombra Vargas *et al.* (2009) evaluaron los extractos etanólicos de hojas de *Heliotropium indicum* (cola de mico), *Lippia origanoides* (orégano de México), *Ricinus communis* (higuerilla) y sus combinaciones, en plantas de plátano “Hartón” de tres meses de edad infectadas con *P. fijiensis*, encontrando que el menor valor del promedio ponderado de la infección, y la mayor posición de la hoja más joven enferma se obtuvo con *H. indicum* + *R. communis*, y el mayor número total de hojas se observó en el tratamiento con *H. indicum* + *L. origanoides* + *R. communis*. En banana clon Gran Enano de tres meses de edad e inoculados con conidios de *P. fijiensis*, Morales *et al.* (2011), encontraron que la aspersión cada 15 días de los extractos acuoso de cundeamor (*Motorbike charantia*), salvia (*Salvia officinalis*) y caña santa (*Cymbopogon citratus*) tuvieron una respuesta similar al tratamiento con Mancozeb.

Asimismo, la combinación de extracto alcohólicos de clavo (*S. aromaticum*) y ajo (*Allium sativum*), en concentraciones de 36 µg mL⁻¹ y 150 µg mL⁻¹, respectivamente, redujeron hasta 41% el desarrollo de la colonia de *P. fijiensis* (Adriano-Anaya *et al.*, 2018). Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia y severidad de Sigatoka Negra en plantas de plátano ‘Macho’, asperjadas con la mezcla del extracto alcohólico de clavo – ajo, bajo condiciones de campo.

El trabajo se realizó en la Estancia Agroecológica “AYOL” de Tapachula, Chiapas (14°49’44.7”N 92°17’48.5”W; 76 msnm; clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano), durante el periodo de septiembre del 2018 a mayo del 2019. Las plantas empleadas fueron hijuelos tipo “espada” de plátano ‘Macho’ de tres meses de edad (1.0-1.2 m de altura) sembradas en parcelas de 100 m² (20 plantas por surco y tres surcos) con distancias de 1.5 m entre plantas y 2.0 m entre surcos. Todas las plantas fueron fertilizadas bimestralmente con

of *P. fijiensis* by up to 41% (Adriano-Anaya *et al.*, 2018). Therefore, the present work aimed to evaluate the incidence and severity of Black Sigatoka in 'Macho' plantain plants sprayed with a mixture of alcoholic extract of clove and garlic, under field conditions.

The work was carried out at the Estancia Agroecológica "AYOL" in Tapachula, in the state of Chiapas (14° 49' 44.7" N 92° 17' 48.5" W; 76 masl; warm humid climate with abundant rains in summer), between September 2018 and May 2019. The plants used were three months old 'Macho' plantain sword type suckers (1.0-1.2 m high) planted in 100 m² plots (20 plants per row and three rows) at distances of 1.5 m between plants and 2.0 m between rows. All plants were fertilized bimonthly with compost (25 kg plant⁻¹) and weekly with biol (4 L plant⁻¹). The non-useful shoots (suckers) were removed every two months and the accompanying flora was subjected to mechanical pruning every 28 days. When required, the plants were hydrated with well water.

To evaluate the effect of the mixture of garlic (150 µg mL⁻¹) and clove (36 µg mL⁻¹) extracts, three treatments (plots) were established according to the frequency of application: in Treatment 1 (T1) the mixture was applied every 7 days; in Treatment 2 (T2) the mixture was applied every 14 days; in Treatment 3 (T3), or control, only an alcohol solution in water was applied. All solutions used commercial soap as adherent. All treatments were applied (5 L manual sprinkler, Truper) between 07:30 and 08:30 am on the top and underside of the leaves up to the dew point.

The garlic extract was prepared by crushing 45 g of garlic material, which was subsequently subjected to reflux extraction (six cycles) with 200 mL of ethanol (60%) at a temperature of 80 °C in a Soxhlet equipment. The extract was stored in an opaque glass container and kept at room

compost (25 kg planta⁻¹) y semanalmente con biol (4 L planta⁻¹). Los brotes (hijuelos) no útiles se eliminaron cada dos meses y la flora acompañante fue sometida a poda mecánica cada 28 días. Cuando así fue requerido, las plantas fueron hidratadas con agua de pozo.

Para establecer el efecto de la aplicación de la mezcla de los extractos de ajo (150 µg mL⁻¹) y de clavo (36 µg mL⁻¹) se establecieron tres tratamientos (parcelas) en función de la frecuencia de aplicación: Tratamiento 1 (T1) aplicación cada 7 días, Tratamiento 2 (T2) aplicación cada 14 días y Tratamiento 3 (T3), o control, aplicación de una solución de alcohol en agua. Todas las soluciones utilizaron jabón comercial como adherente. La aplicación de los tratamientos (aspersor manual Truper de 5 L) fue realizada entre las 07:30 h a 08:30 h en el haz y el envés de las hojas hasta punto de rocío.

El extracto de ajo se preparó triturando 45 g del material, el cual posteriormente fue sometido a extracción por reflujo (seis ciclos) con 200 mL de etanol al 60% a temperatura de 80 °C en un equipo Soxhlet. El extracto se almacenó en recipiente de vidrio opaco y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su empleo (máximo un mes). El extracto de clavo se preparó triturando 100 g del aromático el cual, posteriormente fue homogeneizado en 1 L de etanol (96%) contenido en un recipiente opaco. El homogeneizado se mantuvo a temperatura ambiente por 28 días, durante los cuales fue agitado, manualmente, cada tercer día. Al concluir el tiempo de extracción, el homogeneizado se filtró (Wathman no 1) y se dejó a temperatura ambiente hasta su uso (máximo dos meses). La concentración de sólidos solubles totales de cada extracto se determinó, mediante evaporación (70 °C) de 10 mL, en una termo-balanza (Oahus BL-MB23).

Cada 14 días, y antes de aplicar la mezcla de extractos, en todas las plantas se determinó el número total de hojas (H_T), el promedio ponderado de

temperature until further use (for a maximum of one month). The clove extract was prepared by grinding 100 g of the material, which was subsequently homogenized in 1 L of ethanol (96%) contained in an opaque container. The homogenate was kept at room temperature for 28 days, during which it was manually shaken every third day. At the end of the extraction time, the homogenate was filtered (Wathman no. 1) and kept at room temperature until further use (for a maximum of two months). The concentration of total soluble solids of each extract was determined by evaporation (70 °C) of 10 mL in a thermo-balance (Ohaus BL-MB23).

Every 14 days, and before applying the mixture of extracts, the total number of leaves (TL), the weighted average incidence of BS (I_{BS}), the weighted average severity of BS (S_{BS}), the youngest leaf free of BS symptoms (L_{Y0}), and the time to flowering were determined in all plants. In leaves with BS symptoms, the degree (G) of severity was determined using the Stover scale modified by Gauhl (1989). Leaves that showed a degree of severity of 6 (G6) were removed from the plant. The I_{BS} was calculated as the quotient between the leaves with BS symptoms divided by the total number of leaves [$I_{BS} = (L_{WBS}) / (TL)^{-1}$]. The S_{BS} was calculated by adding the multiplication values between the number leaves (Ln) and the degree of severity of the disease (G0-6) divided by 100 [$S_{BS} = \sum [(G_0L_0) + (G_1H_1) + \dots (G_6H_6)] / (100)^{-1}$]. All the data were subjected to analysis of variance. Significant differences were determined using Duncan's test at $p > 0.05$. The statistical analyses were performed with the software InfoStat Professional Ver. 2018. The results were described and discussed considering that banana plants do not produce leaves after flowering.

Figure 1 shows the flowering dynamics of the 'Macho' banana plantain plants used in the different treatments under study. As can be seen,

incidencia de SN (I_{SN}), el promedio ponderado de la severidad de SN (S_{SN}), la hoja más joven libre de síntomas de SN (H_{MJ0}) y el tiempo a florecimiento. En hojas con síntomas de SN el grado (G) de severidad fue determinado con la escala de Stover modificada por Gauhl (1989); cuando la hoja mostró grado 5 o 6 (G_{5-6}), se eliminó de la planta. El I_{SN} fue calculado mediante el cociente entre las hojas con síntomas de SN dividido entre las hojas totales [$I_{SN} = (H_{SSN}) / (H_T)^{-1}$]. El S_{SN} fue calculada mediante la sumatoria de la multiplicación del número de hojas (N_n) por el grado de la enfermedad (G_{0-6}) dividida entre 100 [$S_{SN} = \sum [(G_0H_0) + (G_1H_1) + \dots (G_6H_6)] / (100)^{-1}$]. Todos los datos fueron sometidos al análisis de varianza y donde se encontró diferencias se aplicó la prueba de Duncan a $p > 0.05$, empleando el programa InfoStat Profesional Ver. 2018. Tomando en consideración que las plantas de plátano ya no emiten hojas después del florecimiento, los resultados de las variables analizadas fueron descritos y discutidos con dicho marco de referencia.

En la Figura 1, se muestra la dinámica del florecimiento de las plantas de plátano 'Macho' empleadas en los diferentes tratamientos de este trabajo. Como se puede observar las plantas del T1 iniciaron el florecimiento a los 140 días después de iniciado el trabajo (DDIT), las del T2 a los 182 días, y ninguna planta del T3 emitió flor durante el periodo de estudio. La cantidad máxima de plantas florecidas (~80%) en T1 y T2 fue alcanzado, respectivamente, a los 196 y 224 DDIT. La observada inducción del florecimiento de las plantas (Figura 1) asperjadas con los extractos de clavo y ajo, puede estar relacionada con los componentes de dichos extractos, ya que ninguna de las plantas del tratamiento control floreció durante el tiempo del trabajo. Así mismo, los resultados de florecimiento orientan a pensar que es necesario alcanzar una concentración crítica para la inducción ya que las plantas asperjadas cada 14 días se "retrasaron" 42 días respecto a las plantas asperjadas cada 7 días.

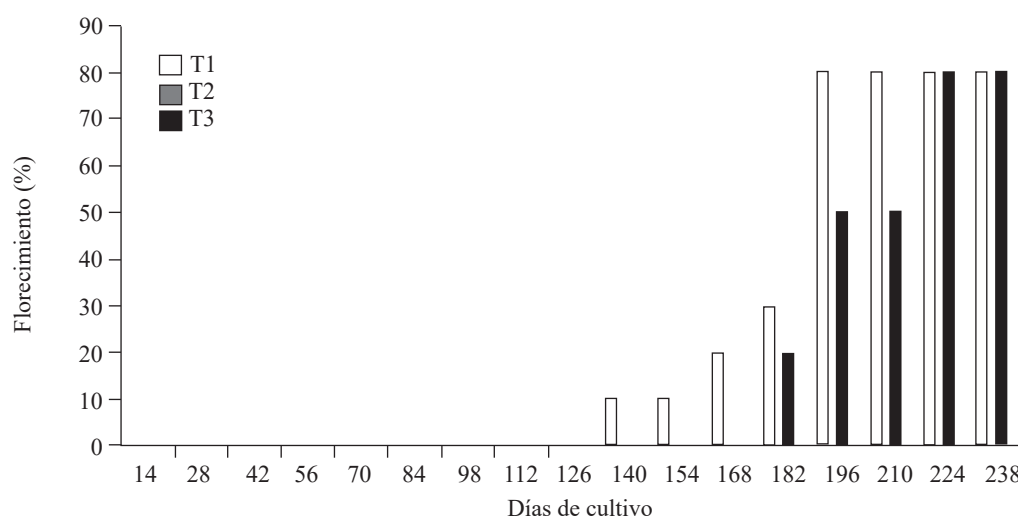


Figure 1. Flowering dynamics of “Macho” plantain plants subjected to Black Sigatoka control treatments with a mixture of clove and garlic extracts. T1: mixture applied every 7 days. T2: mixture applied every 14 days. T3: control plants.
Figura 1. Dinámica de florecimiento de plantas de plátano “Macho” sometidas a los tratamientos de control de Sigatoka Negra con una mezcla de extractos de clavo y ajo. T1: mezcla aplicada cada 7 días, T2: mezcla aplicada cada 14 días y T3: plantas control.

the T1 plants started flowering 140 days after the start of the study (DASS). The T2 plants started at 182 days. No T3 plant produced flowers during the study period. The maximum number of flowering plants (~80%) in T1 and T2 was reached, respectively, at 196 and 224 DASS. The observed induction of flowering in plants (Figure 1) sprayed with clove and garlic extracts may have been related to the components of said extracts, since none of the control treatment plants flowered during the study time. The flowering results suggested that it was necessary to reach a critical concentration to induce flowering since the plants sprayed every 14 days were “delayed” 42 days compared to the plants sprayed every 7 days. The induction of flowering through the spraying of plant extracts is a phenomenon that hadn’t been reported before in studies using plant extracts to control BS (Vargas *et al.*, 2009; Thangavelu *et al.*, 2013; Kumakech *et al.*, 2017). The possible reason could be that in previous studies the extracts were sprayed less frequently than in the present work.

La inducción del florecimiento por el asperjado de extractos de plantas es un fenómeno no reportado en la literatura cuando se han empleado extractos de plantas para el control de la SN (Vargas *et al.*, 2009; Thangavelu *et al.*, 2013; Kumakech *et al.*, 2017) y la posible razón pudiera ser que en general los extractos fueron asperjados con menor frecuencia a la empleada en este trabajo.

Durante todo el tiempo del estudio, las plantas de T1 y T2 tuvieron, respecto a T3, mayor cantidad de H_T , situación que se repite cuando se comparan las H_T hasta antes del inicio del florecimiento y después de iniciado dicho proceso (Cuadro 1). Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas (Duncan $\alpha=0.05$; EE =0.17, 0.15 y 0.12 para T1, T2 y T3, respectivamente). La significativa diferencia entre los tratamientos puede asociarse al daño provocado por la enfermedad, ya que siempre fueron eliminadas las hojas con G_6 . Por lo tanto, cuantas más hojas en la planta, mayor sanidad de la plantación.

During the entire time of the study, the plants of T1 and T2 had, compared to T3, a greater amount of TL, a situation that is repeated when comparing the TL before the beginning of flowering and after the beginning of said process (Table 1). The differences found were statistically significant (Duncan $\alpha=0.05$; EE = 0.17, 0.15 and 0.12 for T1, T2 and T3, respectively). The significant differences between the treatments could be associated with the damage caused by the disease, since the leaves with G_6 were always removed. Therefore, the more leaves on the plants, the greater health of the plantation.

In plants with application of the extract mixture every 7 days (T1) and every 14 days, the I_{BS} (Table 2) was 20.5 and 13.0%, respectively. These values were lower compared to the plants where said extracts were not applied (T3). The differences

Por su parte el I_{SN} (Cuadro 2) en las plantas con aplicación de la mezcla de extractos cada 7 días (T1) y con aplicación de extractos cada 14 días, fue 20.5 y 13.0% menor respecto a las plantas donde no se aplicaron dichos extractos (T3). Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas (Duncan $\alpha=0.05$; EE = 0.01, 0.01 y 0.01 para T1, T2 y T3). La reducción en la I_{SN} , en estudios de campo, escasamente es reportada, sin embargo, Kumakech *et al.* (2017) encontraron 34.8% de disminución en el número de lesiones en vitroplantas de plátanos de las variedades Mpologoma, Mbwazirume y Kibuzi asperjadas con extracto acuoso de *Azadirachta indica*.

Por otro lado, el S_{SN} en las plantas del T3 fue 25.3 y 11.6% mayor respecto a las plantas con frecuencia de aplicación de 7 y 14 días respectivamente

Table 1. Average total leaves in “Macho” plantain plants grown with control of Black Sigatoka based on a mixture of alcoholic extract of garlic and cloves applied every 7 days (1) and 14 days (2). Control plants (3).

Cuadro 1. Promedio de hojas totales en plantas de plátano “Macho” cultivado con control de Sigatoka Negra basado en una mezcla de extracto alcohólico de ajo y clavo aplicada cada 7 días (1), 14 días (2) y plantas control (3).

| Tratamiento | Todo el tiempo | 126 días después de iniciado el trabajo | Después de iniciado el florecimiento |
|-------------|----------------|---|--------------------------------------|
| 1 | 9.25 A | 8.01 AB | 10.63 A |
| 2 | 8.78 B | 8.30 A | 9.34 B |
| 3 | 8.54 C | 7.75 B | 8.54 C |

Table 2. Weighted average of the incidence of Black Sigatoka in “Macho” plantain plants treated with a mixture of alcoholic extract of garlic and cloves applied every 7 days (1) and 14 days (2). Control plants (3).

Cuadro 2. Promedio ponderado de la incidencia de Sigatoka Negra en plantas de plátano “Macho” tratadas con una mezcla de extracto alcohólico de ajo y clavo aplicada cada 7 días (1), 14 días (2) y plantas control (3).

| Tratamiento | Todo el tiempo | 126 días después de iniciado el trabajo | Después de iniciado el florecimiento |
|-------------|----------------|---|--------------------------------------|
| 1 | 0.35 C | 0.36 C | 0.35 C |
| 2 | 0.39 B | 0.40 B | 0.40 B |
| 3 | 0.44 A | 0.46 A | 0.44 A |

found were statistically significant (Duncan $\alpha=0.05$; EE = 0.01, 0.01 and 0.01 for T1, T2 and T3). A decrease in I_{BS} has been rarely reported in field studies. However, Kumakech *et al.* (2017) found a 34.8% decrease in the number of lesions in banana vitroplants of the Mpologoma, Mbwazirume and Kibuzi varieties sprayed with aqueous extract of *Azadirachta indica*.

The S_{BS} in T3 plants was 25.3 and 11.6% higher compared to plants with an application frequency of 7 and 14 days, respectively (Table 3). The differences found were statistically significant (Duncan $\alpha=0.05$; EE = 0.02, 0.03 and 0.03 for T1, T2 and T3). The observed decrease in S_{SN} was lower than that reported by Deshmukh *et al.* (2018), who found average decrease values of 72.8% using aqueous extracts of *Datura ferox* (toloache), *Azadirachta indica* (neem), *Parthenium hyster* (asthma herb), and *Allium sativum* (garlic). It was also lower than the value reported by Thangavelu *et al.* (2013), who found a 55% decrease using an aqueous extract of zimmu leaves (*Allium cepa* x *Allium sativum*). Both of those studies were carried out in “Gran Enano” clone banana plants. However, those studies were conducted under shade house conditions, which limited contact with conidia of *P. fijiensis*. Likewise, the results of S_{SN} obtained in the present work, with the application of the

(Cuadro 3). Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas (Duncan $\alpha=0.05$; EE = 0.02, 0.03 y 0.03 para T1, T2 y T3). La reducción de S_{SN} observada fue inferior a lo reportado por Deshmukh *et al.* (2018), quienes encontraron promedios de reducción de 72.8% utilizando extractos acuosos de *Datura ferox* (toloache), *Azadirachta indica* (neem), *Parthenium hyster* (yerba de asma) y *Allium sativum* (ajo) y a lo reportado por Thangavelu *et al.* (2013) quienes encontraron 55% de reducción con extracto acuoso de hojas de zimmu (*Allium cepa* x *Allium sativum*), ambos en plantas de banano clon Gran Enano. Sin embargo, estos últimos trabajos fueron realizados bajo condiciones de casa sombra donde el contacto con la “atmósfera” de conidios de *P. fijiensis* es limitado. Así mismo, los resultados de S_{SN} , con la aplicación de los extractos de ajo y clavo de este trabajo (0.45 – 0.98), fueron mejores a los reportados por Vargas *et al.* (2009) quienes emplearon extractos etanólicos de hojas secas de *Ricinus communis* (higuerilla), *Heliotropium indicum* (heliotropo indio) y *Lippia origanoides* (oregano de monte) en plátano Musa AAB cv. Hartón, y cuyos valores estuvieron entre 1.84 – 3.15.

Finalmente, los valores de la H_{MJO} se muestran en el Cuadro 4. Durante todo el tiempo que duró el trabajo las plantas del T1 tuvieron, en promedio,

Table 3. Weighted average of the severity of Black Sigatoka in “Macho” plantain plants treated with a mixture of alcoholic extract of garlic and cloves applied every 7 days (1) and 14 days (2). Control plants (3).

Cuadro 3. Promedio ponderado de la severidad de Sigatoka Negra en plantas de plátano “Macho” tratadas con una mezcla de extracto alcohólico de ajo y clavo aplicada cada 7 días (1), 14 días (2) y plantas control (3).

| Tratamiento | Todo el tiempo | 126 días después de iniciado el trabajo | Después de iniciado el florecimiento |
|-------------|----------------|---|--------------------------------------|
| 1 | 0.71 C | 0.74 C | 0.67 C |
| 2 | 0.84 B | 0.85 B | 0.78 B |
| 3 | 0.95 A | 0.97 A | 0.95 A |

garlic and clove extracts (0.45 - 0.98), were better than those reported by Vargas *et al.* (2009), who used ethanolic extracts from dry leaves of *Ricinus communis* (castor bean), *Heliotropium indicum* (Indian heliotrope), and *Lippia origanoides* (mexican oregano) on *Musa* bananas AAB cv. Harton, with values between 1.84 and 3.15.

Table 4 shows the values of the L_{y0} . During the entire time of the study, the T1 plants had, on average, 1.57 healthier leaves than the control plants (T3). The BS symptoms were observable in older leaves (lower leaves). The number of leaves free of BS symptoms in plants to which the mixture of garlic and clove extracts had been applied increased, compared to control plants, after the start of flowering. The differences found were statistically significant (Duncan $\alpha=0.05$; EE = 0.15, 0.14 and 0.11 for T1, T2 and T3).

In the control plants, the L_{y0} was similar to that reported by Torrado-Jaime and Castaño-Zapata (2018) for the plantain and banana varieties Dominico Harton, Africa, FHIA 20, and FHIA 21. The L_{y0} of control plants was lower than that reported by Thangavelu *et al.* (2013) for the 'Gran Enano' banana clone (youngest diseased leaf 7.6). However, in the plants to which the mixture of extracts was applied every 7 days and every 14 days (Table 4), the L_{y0} was better than that reported by Vargas *et al.* (2009), who reported the youngest

1.57 hojas más sanas que las plantas control (T3) es decir, los síntomas de SN fueron observables en hojas de mayor edad (hojas más "bajas"). La cantidad de hojas libres de síntomas de SN en las plantas donde se aplicó la mezcla de los extractos de ajo y clavo se incrementó, respecto a las plantas control, después de iniciado el florecimiento. Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas (Duncan $\alpha=0.05$; EE = 0.15, 0.14 y 0.11 para T1, T2 y T3).

La H_{Mj0} en las plantas control de este trabajo fue similar a lo reportado por Torrado-Jaime y Castaño-Zapata (2018) para plátano de las variedades Dominico Hartón, África, FHIA 20 y FHIA 21 y menor que lo reportado por Thangavelu *et al.* (2013) para banano clon 'Gran Enano' (hoja más joven enferma 7.6). Sin embargo, la H_{Mj0} en las plantas con aplicación de la mezcla de los extractos cada 7 días y cada 14 días (Cuadro 4), fue mejor a lo reportado por Vargas *et al.* (2009) quienes reportaron la hoja más joven sin síntomas de SN entre 1.42 y 3.75 cuando asperjaron en plantas de plátano (*Musa* AAB cv. Hartón) extractos etanólicos de hojas de *R. communis*, *H. indicum* y *L. origanoides*; aunque menor a lo reportado por Thangavelu *et al.* (2013) para banano clon 'Gran Enano' asperjado con extracto de zimmu.

En conclusión, la aplicación cada 7 o 14 días de la combinación de extractos alcohólicos de clavo

Table 4. Average of the youngest leaf free of symptoms of Black Sigatoka in "Macho" plantain plants treated with a mixture of alcoholic extract of garlic and cloves applied every 7 days (1), 14 days (2) and control plants (3).
Cuadro 4. Promedio de la hoja más joven libre de síntomas de Sigatoka Negra en plantas de plátano "Macho" tratadas con una mezcla de extracto alcohólico de ajo y clavo aplicada cada 7 días (1), 14 días (2) y plantas control (3).

| Tratamiento | Todo el tiempo | 126 días después de iniciado el trabajo | Después de iniciado el florecimiento |
|-------------|----------------|---|--------------------------------------|
| 1 | 7.16 A | 6.29 A | 8.00 A |
| 2 | 6.38 B | 5.86 B | 7.33 B |
| 3 | 5.59 C | 5.16 C | 5.70 C |

leaf without BS symptoms between 1.42 and 3.75 when spraying ethanolic extracts from leaves of *R. communis*, *H. indicum* and *L. origanoides* on banana plants (Musa AAB cv. Hartón). However, the H_{MJO} was lower than that reported by Thangavelu *et al.* (2013) for 'Gran Enano' banana clone sprayed with a zimmu extract.

In conclusion, the application, every 7 or 14 days, of a combination of alcoholic extracts of clove and garlic (36 and 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was able to control BS and induce flowering in "Macho" banana plantain plants, under field conditions.

CITED LITERATURE

- Adriano-Anaya ML, Mejía-Ortiz J, Ovando-Medina I, Albores-Flores V y Salvador-Figueroa M. 2018. Efecto de extractos alcohólicos de ajo (*Allium sativum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) en el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Revista Mexicana de Fitopatología 36: 379-393. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1805-2>
- Deshmukh R, Dhutraj SV and Damodhar VP. 2018. Field evaluation of bio-control agent and phyto-extract against intensity of Sigatoka leaf spot and yield of banana cv. Ardhapuri. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Special Issue-6: 101- 104. ISSN 2319-7706. <https://www.ijcmas.com>
- Garrido-Ramírez ER, Hernández-Gómez E y Noriega-Cantú DH. 2011. Manual de producción de banano para la región del Soconusco. Estrategias para el manejo de la Sigatoka Negra. Folleto Para Productores N° 10. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Centro de Chiapas, Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. 35p.
- Gauhl F. 1989. Untersuchunge zurepidemiologie un okoloigie de Schuwargen sigatoka krankheit (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) an kockbonanen (*Musa sp.*) in Costa Rica. Thesis. Univ. Gottingen (West Germany), 128 p.
- Geissen V, Ramos FQ, de JB-BP, Diaz-Gonzalez G, Bello-Mendoza R, Huerta-Lwanga E and Ruiz-Suarez LE. 2010. Soil and water pollution in a banana production region in tropical Mexico. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 85:407-413. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0077-y>
- Hidalgo M, Tapia A, Rodríguez W y Serrano E. 2006. Efecto de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa sp.* AAA, cv. Valery). Agronomía Costarricense 30: 35-41. ISSN 0377-9424. <https://revistas.ucr.ac.cr>
- Kumakech A, Jørgensen H JL, Collinge DB, Edema R y Okori P. 2017. *Azadirachta indica* reduces Black Sigatoka in east African highland banana by direct antimicrobial effects against *Mycosphaerella fijiensis* without inducing resistance. Journal of Agricultural Science 9: 61-76. <https://doi.org/10.5539/jas.v9n4p61>.
- Marín DH, Romero RA, Guzmán M and Sutton TB. 2003. Black sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Disease 87:208-222. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.208>
- Martínez I y Guzmán M. 2010. Sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a fungicidas. Pags. 227-238. In: Informe Anual 2009, Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Morales LM, Ullauri MA y Rojas X. 2011. Evaluación del efecto de extractos vegetales como alternativa de manejo a la Sigatoka Negra en el cultivar Gran Enano (AAA). Centro Agrícola 38(2): 77-84. <http://cagricola.uclv.edu.cu>
- Mosquera OP, Echeverry LM y Niño J. 2009. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Scientia et Technica 41: 232 - 236. ISSN 0122-1701. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916680041>
- Okigbo RN y Emoghene AO. 2003. Antifungal activity of leaf extracts of some plant species on *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, the causal organism of Black Sigatoka disease in banana (*Musa acuminata*). Nigerian Journal of Plant Protection. 20: 101-110. <https://www.scirp.org>
- Orozco-Santos M, Orozco-Romero J, Pérez-Zamora O, Manzo-Sánchez G, Farías-Larios J y da Silva-Morales W. 2008. Prácticas culturales para el manejo de la sigatoka negra en bananos y plátanos. Tropical Plant Pathology 33:189-196. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000300003>
- Riveros AS y Arciniegas AM. 2003. Productos naturales como biofungicidas e inductores de resistencia para el manejo de la Sigatoka negra. Pags. 31-32. In: Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Actas del Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. INIBAP, Montpellier. Guayaquil, EC.
- Thangavelu R, Ganga Devi P, Gopi M and Mustaffa MM. 2013. Management of Eumusae leaf spot disease of banana caused by *Mycosphaerella eumusae* with Zimmu (*Allium sativum* x *Allium cepa*) leaf extract. Crop Protection 46: 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.12.022>

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

Torrado-Jaime M y Castaño-Zapata J. 2018. Incidencia y severidad de las sigatokas negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach et Mulder) del plátano según los estados fenológicos. *Agronomía Colombiana* 26: 435-442. ISSN 0120-9965. <http://www.scielo.org.co/>

Vargas JL, Rodríguez D, Sanabria ME y Hernández J. 2009. Efecto de tres extractos vegetales sobre la Sigatoka negra del plátano (*Musa* AAB cv. Hartón). *Revista UDO Agrícola*. 9: 182-190. <https://www.researchgate.net/publication/47372025>

# ***In vitro* evaluation of biological fungicides against *Curvularia eragrostidis*, a phytopathogenic fungus of pineapple crop**

## **Evaluación *in vitro* de fungidas biológicos contra *Curvularia eragrostidis*, hongo fitopatógeno del cultivo de piña**

Eduardo Hernández-Navarro, Gustavo Ángel Agustín-Maravilla, Juan Carlos Sánchez-Rangel, Pedro Valadez-Ramírez, Wilberth Chan-Cupul\*, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Km 40 autopista Colima-Manzanillo, C.P. 28934, Tecmán, Colima, México.

\*Corresponding author: wchan@uacol.mx

Received: June 10, 2022.

Accepted: December 14, 2022.

Hernández-Navarro E, Agustín-Maravilla GA, Sánchez-Rangel JC, Valadez-Ramírez P and Chan-Cupul W. 2023. *In vitro* evaluation of biological fungicides against *Curvularia eragrostidis*, a phytopathogenic fungus of pineapple crop. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 93-111.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-4>

First DOI publication: December 27, 2022.

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2022.

**Abstract.** *In vitro* effectiveness of two plant extract-based products, System Max® (*Mimosa tenuiflora* + *Quercus robur*) and Sedric 4X® (*Yucca schidigera*); and three biological control agents-based products, BliteFree® (*Streptomyces* spp.), BioFungus Clean® (*Bacillus subtilis* + *B. thuringiensis* + *Trichoderma harzianum* + *T. viride*), and Tonka® (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* + *Streptomyces lydicus*)

**Resumen.** Se evaluó la eficacia *in vitro* contra *Curvularia eragrostidis* de dos productos a base de extractos de plantas, System Max® (*Mimosa tenuiflora* + *Quercus robur*) y Sedric 4X® (*Yucca schidigera*), y tres productos a base de agentes de control biológico, BliteFree® (*Streptomyces* spp.), BioFungus Clean® (*Bacillus subtilis* + *B. thuringiensis* + *Trichoderma harzianum* + *T. viride*) y Tonka® (*Bacillus subtilis* + *T. harzianum* + *Streptomyces lydicus*). El fitopatógeno fue aislado de manchas foliares en plantas de piña (*Ananas comosus*). La cepa fue identificada por reconstrucción filogenética usando las secuencias rDNA ITS1-5.8S-ITS2 como *Curvularia eragrostidis*. En bioensayos dosis respuesta se evaluaron cinco concentraciones: 0 (control), 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0% de cada producto comercial. Se midió el crecimiento diario del micelio (CDM), la inhibición del crecimiento del micelio (% ICM) y la concentración letal media (CL<sub>50</sub>). Sedric 4X® mostró el % ICM más alto (75%) a la concentración más alta, mientras que Tonka® mostró

were evaluated against *Curvularia eragrostidis*, an associated fungus to leaf spot disease in pineapple (*Ananas comosus*) plants. The strain was identified by phylogenetic reconstruction using the rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences as *Curvularia eragrostidis*. Through a doses response-bioassays five concentrations: 0 (control), 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0% of each commercial product were tested. Daily mycelial growth (DMG), mycelial growth inhibition (% MGI) and the lethal mean concentration ( $LC_{50}$ ) were calculated. Sedric 4X® showed the highest% MGI (75%) at highest concentration, while Tonka® showed the highest% MGI (65%) at lower concentration, being constant (65.3-66.9%) at all the concentrations tested. The lowers values of  $EC_{50}$  were achieved by Tonka® (0.008%), BliteFree® (0.015%) and BioFungus Clean® (0.017%). In contrast, the highest  $CE_{50}$  were reached by Sedric 4X® (0.260%) and System Max® (3.5%). SystemMax® and Sedric 4X®, showed a positive relation between concentration and% MGI, despite its highest  $CE_{50}$  values. The biofungicides seem to be more effective against *C. eragrostidis* than plant extracts fungicides.

**Key words:** *Bacillus*,  $CL_{50}$ , phytopathogen, *Trichoderma*, *Streptomyces*.

Pineapple (*Ananas comosus*) is the third most important tropical crop worldwide (Sanewski *et al.*, 2018). *Curvularia clavata* is the causal agent of leaf spot in pineapple plants with incidences from 35 to 58% in China (Zhong *et al.*, 2016) and *C. eragrostidis* causes a post-harvest loss in pineapple fruit in Brazil (Ferreira *et al.*, 2014), and *Curvularia* sp. causes leaf spot in pineapple crop fields in Nicaragua (García-Osorio and Orozco-Gomez, 2016). Mexico is the 7<sup>th</sup> producer of pineapple (INEGI, 2019) around the world.

el% ICM más alto (65%) a la concentración más baja, siendo constante (65.3-66.9%) en todas las concentraciones probadas. Los valores más bajos de  $CL_{50}$  los alcanzaron Tonka® (0.008%), BliteFree (0.015%) y BioFungus Clean® (0.017%). En cambio, los  $CL_{50}$  más altos los alcanzaron Sedric 4X® (0.260%) y System Max® (3.5%). SystemMax® y Sedric 4X® mostraron una relación positiva entre concentración y% ICM, a pesar de sus valores altos de  $CL_{50}$ . Los biofungicidas fueron más efectivos que los fungicidas a base de extractos de plantas.

**Palabras clave:** *Bacillus*,  $CL_{50}$ , fitopatógeno, *Trichoderma*, *Streptomyces*.

La piña (*Ananas comosus*) es el tercer cultivo tropical más importante en todo el mundo (Sanewski *et al.*, 2018). *Curvularia clavata* es el agente causal de la mancha foliar en plantas de piña, con una incidencia de entre 35 y 58% en China (Zhong *et al.*, 2016). *Curvularia eragrostidis* causa pérdidas poscosecha en frutos de piña en Brasil (Ferreira *et al.*, 2014). *Curvularia* sp. causa mancha foliar en campos de cultivo de piña en Nicaragua (García-Osorio y Orozco-Gomez, 2016). México es el 7° productor de piña (INEGI, 2019) a nivel mundial. Recientemente, Maldonado-Michel *et al.* (2021) reportaron a *C. eragrostidis* como el agente causal de la mancha foliar de la piña en el estado de Colima (Pacífico Centro de México). Sin embargo, ese estudio carece de datos moleculares para una identificación precisa de las especies. También probaron la actividad antifúngica de los extractos de semillas de *Swietenia humilis*. No obstante, el manejo local regular de enfermedades fúngicas incluye fungicidas químicos, a pesar de que los principales efectos secundarios de estos productos están relacionados con daños a la salud humana, impacto ambiental severo y desarrollo de cepas resistentes (Heydari



Recently, Maldonado-Michel *et al.* (2021) reported *C. eragrostidis* as the causal agent of pineapple leaf-spot in Colima state (Pacific Center of Mexico). However, this study lacks molecular data for accurate species identification. They also tested seed extracts of *Swietenia humilis* for antifungal activity. However, the regular local management of fungal diseases includes chemical fungicides, despite the fact that the main side-effects of these products are related to damage to human health, severe environmental impact, and development of resistant strains (Heydari and Pessarakli, 2010). Therefore, there is a need to evaluate alternative methods such as biological control agents (BCA) and plant extracts (PE), which have shown to be safer and efficient (Cerqueira-Sales *et al.*, 2016) against *C. eragrostidis*. In Colima, Mexico some BCA and PE bio fungicides are available but have not been locally and properly tested; the main goal of this research were to identify the causal agent of the leaf-spot disease in pineapple and to evaluate the *in vitro* effectiveness of five commercial biological products against *C. eragrostidis*.

Plants with leaf spot symptoms were sampled randomly in a pineapple (cv. MD2) plantation in Tecoman, Colima, Mexico (18°47'41.3" N; 103°51'26.9" W). Ten samples were collected in 2 ha. Fungal isolation was carried out according to Orozco-Santos *et al.* (2004); infected leaves were cut, washed with 1% NaClO for 3 min, rinsed with autoclaved distilled water, and dried on sterile filter paper. Disinfected plant tissue was ground in liquid nitrogen and then lyophilized. This served as an inoculum in 400 mL of Czapek broth shaken at 2 Hz at room temperature for 3 d. After that, 50, 100, and 150 µL of culture were inoculated in Petri dishes with PDA and incubated at 31 °C for 3 d. Individual colonies were transferred and incubated for 5 d and used as inoculum for microcultures in slides with PDA (Zhong *et al.*, 2016).

y Pessarakli, 2010). Por lo tanto, existe la necesidad de evaluar métodos alternativos como el uso de agentes de control biológico (ACB) y extractos de plantas (EP), que han demostrado ser más seguros y eficientes (Cerqueira-Sales *et al.*, 2016) contra *C. eragrostidis*. En Colima, México, están disponibles algunos biofungicidas ACB y EP, pero no se han probado localmente y de manera adecuada. El objetivo principal de esta investigación fue identificar el agente causal de la enfermedad de la mancha foliar en piña y evaluar la efectividad *in vitro* de cinco productos biológicos comerciales contra *C. eragrostidis*.

Se tomaron muestras al azar de plantas con síntomas de mancha foliar en una plantación de piña (cv. MD2) en Tecomán, Colima, México (18° 47' 41.3" N; 103° 51' 26.9" O). Se recolectaron diez muestras en 2 hectáreas. El aislamiento fúngico se realizó de acuerdo con Orozco-Santos *et al.* (2004). Las hojas infectadas se cortaron, se lavaron con NaClO al 1% durante 3 min, se enjuagaron con agua destilada en autoclave y se secaron en papel de filtro estéril. El tejido vegetal desinfectado se molió en nitrógeno líquido y luego se liofilizó. Esto sirvió como inóculo en 400 mL de caldo Czapek agitado a 2 Hz a temperatura ambiente por 3 días. Posteriormente, se inocularon 50, 100 y 150 µL de cultivo en cajas de Petri con PDA y se incubaron a 31 °C durante 3 días. Las colonias individuales se transfirieron e incubaron durante 5 días y se usaron como inóculo para microcultivos en portaobjetos con PDA (Zhong *et al.*, 2016).

La identificación morfológica se realizó siguiendo a Ferreira *et al.* (2014), Manamgoda *et al.* (2012) y Rocha-Santos *et al.* (2018). Se utilizaron muestras de cultivos monoconidiales para la identificación molecular mediante la secuenciación de la región parcial ITS utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Las secuencias se inspeccionaron mediante cromatogramas utilizando

Morphological identification was carried out following Ferreira *et al.* (2014), Manamgoda *et al.* (2012) and Rocha-Santos *et al.* (2018). Samples of monoconidial cultures were used for molecular identification through sequencing of the ITS partial region with the ITS1 and ITS4 primers (White *et al.*, 1990). The sequences were inspected by chromatograms on the SequencherSoftware™ v. 5.2.3 and curated sequence was used for BLASTN query at NCBI's GenBank. Then, a MegaBlast was performed, and 48 highly similar *Curvularia* sequences (ex-types, Figure 1) and two outgroup sequences were downloaded from GenBank, aligned using the CLUSTALW algorithm with default parameters (Thompson *et al.*, 2003), and manually edited using MEGA X software suite (Tamura *et al.*, 2013). The molecular phylogenetic analysis consisted of a Maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis, with the Kimura-2-parameter+G+I model (Kimura, 1980) with gaps treated as partial deletions with a 95% of coverage, using an NNI heuristic method for topology improvement with 1000 bootstrap replicates. The trees were rooted using *Bipolaris maydis* (= *Cochliobolus heterostrophus*) as sister clade and *Alternaria alternata* as outgroup (Manamgoda *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2018).

Commercial biofungicides are detailed in Table 1. Based on their concentrations, four doses were evaluated: 1.0, 0.5, 0.25 and 0.125% (v/v or w/v) in 20 mL of PDA + biofungicide. Solid products were expressed in mg L<sup>-1</sup> and liquid products were expressed in mL L<sup>-1</sup>. Amended PDA Petri dishes were obtained in two ways: 1) PE-based, and 2) BCA-based. PE products (System Max® / Sedric 4X®) were added to PDA before solidification and then served in Petri dishes. BCA products were mixed in the PDA and 20 mL were verted in Petri dishes. In each Petri dish, a disk of 9 mm in diameter of fungal pathogen that was 7 d old was inoculated and incubated at 29 °C for 10 d.

el programa Sequencher™ v. 5.2.3. La secuencia curada se usó para consulta BLASTN en el GenBank de NCBI. Después se realizó un MegaBlast y se descargaron de GenBank 48 secuencias de *Curvularia* muy similares (Figura 1) y dos secuencias de grupos externos. Estas secuencias se alinearon usando el algoritmo CLUSTALW con parámetros predeterminados (Thompson *et al.*, 2003) y se editaron manualmente utilizando el paquete de software MEGA X (Tamura *et al.*, 2013). El análisis filogenético molecular consistió en un análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) con el modelo Kimura de 2 parámetros G+I (Kimura, 1980). Los huecos fueron tratados como deleciones parciales con un 95% de cobertura, utilizando un método heurístico NNI (intercambio del vecino más cercano, por sus siglas en inglés) para refinar la topología del árbol con 1000 réplicas de arranque. Los árboles se enraizaron utilizando *Bipolaris maydis* (= *Cochliobolus heterostrophus*) como clado hermano y *Alternaria alternata* como grupo externo (Manamgoda *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2018).

El Cuadro 1 muestra los detalles de los biofungicidas comerciales. Se evaluaron cuatro dosis con distintas concentraciones: 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125% (v/v o p/v) en 20 mL de PDA + biofungicida. Los productos sólidos se expresaron en mg L<sup>-1</sup> y los líquidos en mL L<sup>-1</sup>. Las cajas de Petri con PDA suplementadas se prepararon de dos formas: 1) a base de EP y 2) a base de ACB. Los productos de EP (System Max®/Sedric 4X®) se agregaron al PDA antes de la solidificación y después se sembraron en cajas de Petri. Los productos ACB se mezclaron en el PDA y se vertieron 20 mL en cajas de Petri. En cada placa de Petri se inoculó un disco de 9 mm de diámetro del hongo patógeno de 7 días de edad y se incubó a 29 °C durante 10 días.

La tasa de crecimiento diario (TCD) se calculó midiendo el diámetro de la colonia del patógeno cada 24 horas durante 5 días usando la fórmula  $TCD = [(R1-R0)/(T1-T0)]$ , donde R1 y R0 es el

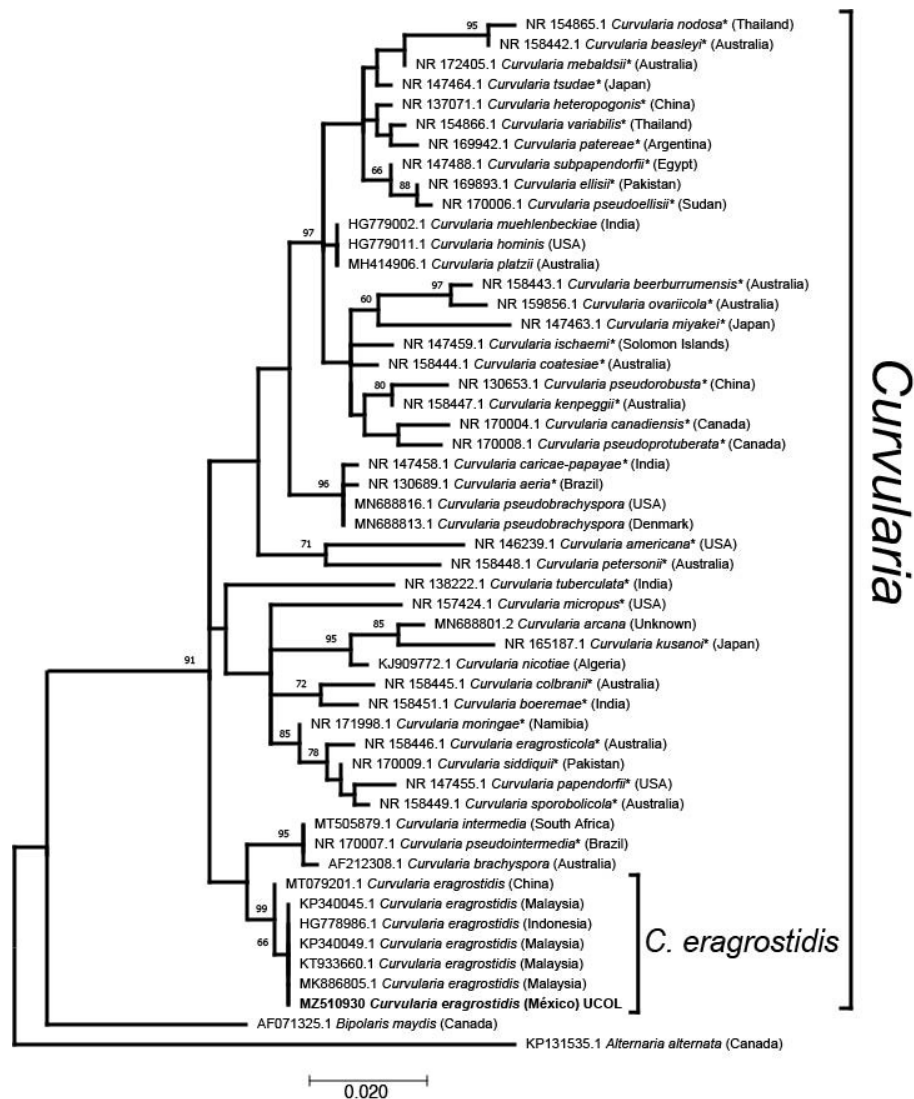


Figure 1. Molecular phylogenetic analysis of *Curvularia* species based on the Maximum likelihood method using the Kimura 2-parameter (G+I) model. The tree with the highest log likelihood (-1962.89) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches, based on 1000 bootstrap replicates. Accession number is indicated in each taxon. Taxa names marked with \* are ex-type material. Country of origin of isolates are in parenthesis.

Figura 1. Análisis filogenético molecular de especies de *Curvularia* basado en el método de Máxima verosimilitud y utilizando el modelo Kimura de 2 parámetros (G+I). Se muestra el árbol con el logaritmo de probabilidad más alto (-1962.89). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas, según 1000 réplicas de arranque. El número de accesoión se indica en cada taxón. Los nombres de taxones marcados con \* son material ex-tipo. El país de origen de los aislamientos está entre paréntesis.

Daily growth rate (DGR) was calculated by measuring pathogen colony diameter each 24 h for 5 d using the formula  $DGR = [(R1 - R0) / (T1 - T0)]$ ,

crecimiento del diámetro de la colonia (mm) y T1 y T0 es el tiempo (días) (Bahekar *et al.*, 2017). La inhibición del crecimiento micelial del patógeno

**Table 1. Characteristics of the biological products evaluated in the doses response bioassay.**  
**Cuadro 1. Características de los productos biológicos evaluados en el bioensayo dosis respuesta.**

| Commercial name                       | Active ingredient                                                                                       | Recommended doses       | Concentration                                                                                                            |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| System Max®<br>(Plantoria)            | <i>Mimosa tenuiflora</i> extract +<br><i>Quercus robur</i> extract                                      | 4.5 mL L <sup>-1</sup>  | 60 and 30 %                                                                                                              |
| Sedric 4X®<br>(BioCampo)              | <i>Yucca schidigera</i> extract                                                                         | 3 L ha <sup>-1</sup>    | 2.16 %                                                                                                                   |
| BliteFree®<br>(Altus Biopharm)        | <i>Streptomyces</i> spp.                                                                                | 1.5 L ha <sup>-1</sup>  | 60 %                                                                                                                     |
| BioFungus Clean®<br>(Syme Agroinsumo) | <i>Bacillus subtilis</i> + <i>B. thuringiensis</i> +<br><i>Trichoderma harzianum</i> + <i>T. viride</i> | 2 L ha <sup>-1</sup>    | 1.0, 1.0, 1.0 and 1.0 %                                                                                                  |
| Tonka®<br>(Novigo Natura)             | <i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i> +<br><i>Streptomyces lydicus</i>                               | 1.5 kg ha <sup>-1</sup> | 1x10 <sup>8</sup> UFC g <sup>-1</sup> 1x10 <sup>7</sup> UFC g <sup>-1</sup><br>and 1x10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup> |

where R1 and R0 is the colony diameter growth (mm) and T1 and T0 is the time (days) (Bahekar *et al.*, 2017). Mycelial Growth Inhibition of the pathogen (% MGI) was calculated  $\% \text{ MGI} = [(C - T)/C] \times 100\%$  where C = Control growth diameter (mm) and T = Treatment growth diameter (mm) (Bahekar *et al.*, 2017). Fifty and ninety effective concentrations (EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub>) were calculated using a Probit analysis in SAS 9.0 (Manzo-Sánchez *et al.*, 2018). The experimental design consisted of a completely randomized design with the combinatorial factorial arrangement, being A the biological products brand and B the different doses of each product. Five biological products, four doses each, and a control (no product); each treatment had six repetitions, with a total of 126 experimental units. Data analysis of DGR was carried out with an ANOVA and mean comparison using the minimum significant difference (MSD) with  $p=0.05$ . Percentage of MGI data were transformed using the arcsen equation  $(\% \text{ MGI})^{1/2}$  to obtain an approximately normal distribution and posterior analysis. The CL<sub>50</sub> was calculated with a Probit analysis. Finally, a linear regression analysis ( $Y=mX+b$ ) between the concentration of the product (X) and percentage of MGI (Y) were performed.

(% ICM) se calculó como  $\% \text{ ICM} = [(C - T)/C] \times 100\%$ , donde C = diámetro de crecimiento del control (mm) y T = diámetro de crecimiento del tratamiento (mm) (Bahekar *et al.*, 2017). Se calcularon las concentraciones efectivas media y noventa (CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub>) mediante un análisis Probit en SAS 9.0 (Manzo-Sánchez *et al.*, 2018). El diseño experimental consistió en un diseño completamente al azar con arreglo factorial combinatorio, siendo A la marca del producto biológico y B las diferentes dosis de cada producto. Cinco productos biológicos, cuatro dosis cada uno, y un control (sin producto). Cada tratamiento tuvo seis repeticiones, con un total de 126 unidades experimentales. El análisis de datos de TCD se llevó a cabo con ANOVA y comparación de medias utilizando la diferencia mínima significativa (DMS), con  $P=0.05$ . El porcentaje de datos de ICM se transformó utilizando la ecuación de arcsen  $(\% \text{ ICM})^{1/2}$  para obtener una distribución aproximadamente normal y someter a análisis más tarde. La CE<sub>50</sub> se calculó con un análisis Probit. Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal ( $Y=mX+b$ ) entre la concentración del producto (X) y el porcentaje de ICM (Y).

El aislado mostró características morfológicas macro y microscópicas coincidentes con *Curvularia eragrostidis*, como una colonia gris algodonosa

The isolate showed macro and microscopic morphological characteristics matching with *Curvularia eragrostidis*, such as a cottony grayish colony (7.7 cm, 5 d of incubation) turning into velvety-black with regular edges. Ellipsoidal distoseptate conidia, 21.6–24.9 × 11.6–13.3 µm. Grouped and septate brown conidiophores. Mycelium is composed of dark septate hyphae. Molecular phylogenetic analysis of *Curvularia* species based on the maximum likelihood method, grouped the sequence with the aforementioned with high support, confirming the identity of the studied isolate as *C. eragrostidis*. As expected, Chinese material is slightly different from the isolates from Malaysia, Indonesia and Mexico. *C. eragrostidis* closest subclade, includes *C. intermedia*, *C. pseudointermedia* and *C. brachyspora* (Figure 1). All sequences were grouped within the monophyletic genus *Curvularia* with high support, separated from *Bipolaris maydis*, a sister anamorphic clade, which matches with Manamgoda *et al.* (2012) and Tan *et al.* (2018).

*C. eragrostidis* daily growth was affected by biological products with highly significant differences ( $P \leq 0.0001$ , Table 2). The DGR of the

(7.7 cm, 5 días de incubación) que se tornó negra aterciopelada con bordes regulares. Conidios elipsoidales, distoseptados, de 21.6–24.9 × 11.6–13.3 µm. Conidióforos marrones, agrupados y septados. El micelio se compone de hifas septadas oscuras. El análisis filogenético molecular de especies de *Curvularia*, basado en el método de máxima verosimilitud, agrupó la secuencia con la anterior con alto apoyo estadístico, confirmando la identidad del aislado estudiado como *C. eragrostidis*. Como era de esperar, el material chino es ligeramente diferente de los aislamientos de Malasia, Indonesia y México. El subclado más cercano de *C. eragrostidis* incluye *C. intermedia*, *C. pseudointermedia* y *C. brachyspora* (Figura 1). Todas las secuencias fueron agrupadas dentro del género monofilético *Curvularia* con alto apoyo estadístico, separadas de *Bipolaris maydis*, un clado anamórfico hermano, un resultado que coincide con Manamgoda *et al.* (2012) y Tan *et al.* (2018).

El crecimiento diario de *C. eragrostidis* fue afectado por los productos biológicos, con diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.0001$ , Cuadro 2). La TCD del grupo control fue de 1.6 cm día<sup>-1</sup>, mientras que Tonka® mostró la tasa de crecimiento más

**Table 2. *In vitro* daily growth rate (cm day<sup>-1</sup>) of *Curvularia eragrostidis* under different doses of biological products.**

**Cuadro 2. Tasa de crecimiento diario *in vitro* (cm día<sup>-1</sup>) de *Curvularia eragrostidis* bajo diferentes dosis de productos biológicos.**

| Commercial products | Doses (%)     |               |               |               |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                     | 0.125         | 0.25          | 0.5           | 1.0           |
| Control             | 1.635±0.018 b | 1.635±0.018 e | 1.635±0.018 c | 1.635±0.018 c |
| System Max®         | 1.698±0.007 b | 1.476±0.015 d | 1.298±0.031 b | 1.186±0.057 b |
| Sedric 4X®          | 1.571±0.056 b | 0.27±0.016 c  | 0.173±0.008 a | 0.048±0.007 a |
| Tonka®              | 0.01±0.006 a  | 0.028±0.006 a | 0.013±0.008 a | 0.018±0.013 a |
| BioFungus Clean®    | 0.026±0.009 a | 0.12±0.054 b  | 0.086±0.030 a | 0.04±0.010 a  |
| Blite Free®         | 0.036±0.004 a | 0.026±0.009 a | 0.181±0.169 a | 0.021±0.010 a |
| <b>P-value</b>      | 0.00001       | 0.00001       | 0.00001       | 0.00001       |
| <b>F=</b>           | 1135.94       | 523.85        | 46.12         | 353.54        |

Means (± SE) with different letters in the same column indicates significant differences (LSD,  $P \leq 0.05$ ). / Medias (± ES) con diferente literal en la misma columna indica diferencias significativas (DMS,  $P \leq 0.05$ ).



control group was 1.6 cm day<sup>-1</sup>, while Tonka® showed the lowest growth rate in all four evaluated concentrations with a DGR mean of 0.015 cm day<sup>-1</sup>, which is 106.6 times lower than the control group. The BioFungus Clean® activity had a similar effect in the first three concentrations (1.0, 0.5, and 0.25%) with a mean of 0.082 cm day<sup>-1</sup>. SystemMax® and Sedric 4X®, only reduced the DGR of *C. eragrostidis* from 0.25% and beyond with 1.47 and 0.27 cm day<sup>-1</sup>; however, at 1.0% (0.048 cm day<sup>-1</sup>) was statistically equal between Tonka®, Biofungus Clean® and BliteFree® with 0.02, 0.04 and 0.021 cm day<sup>-1</sup>, respectively. The % MGI achieved significant differences ( $P \leq 0.0001$ ) at 5 d after inoculation. Sedric 4X® showed the highest inhibition percentage at 1% concentration (86.8%), 2.5 times higher than System Max® and 1.3 times higher than BliteFree® (63.7%) at the same concentration. This value was significantly higher ( $P \leq 0.0001$ ) than the other concentrations of the same product (Table 3). On the other hand, Tonka® was effective in every concentration with no statistical differences ( $P \leq 0.2657$ ) between all four doses, with a mean of 68.97% of inhibition. Similarly, Biofungus Clean® had the same

baja con las cuatro concentraciones evaluadas, con una TCD media de 0.015 cm día<sup>-1</sup>, que es 106.6 veces menor que la del grupo control. La actividad de BioFungus Clean® tuvo un efecto similar en las tres primeras concentraciones (1.0, 0.5 y 0.25%) con una media de 0.082 cm día<sup>-1</sup>. SystemMax® y Sedric 4X® solo redujeron la TCD de *C. eragrostidis* a partir de una concentración de 0.25% con 1.47 y 0.27 cm día<sup>-1</sup>; sin embargo, al 1.0% (0.048 cm día<sup>-1</sup>), la reducción fue estadísticamente igual entre Tonka®, Biofungus Clean® y BliteFree®, con 0.02, 0.04 y 0.021 cm día<sup>-1</sup>, respectivamente. El %ICM logró diferencias significativas ( $P \leq 0.0001$ ) a los 5 días después de la inoculación. Sedric 4X® mostró el mayor porcentaje de inhibición al 1% de concentración (86.8%), 2.5 veces mayor que System Max® y 1.3 veces mayor que BliteFree® (63.7%) a la misma concentración. Este valor fue significativamente mayor ( $P \leq 0.0001$ ) que las demás concentraciones del mismo producto (Cuadro 3). Por otro lado, Tonka® fue efectivo en todas las concentraciones, sin diferencias estadísticas ( $P \leq 0.2657$ ) entre las cuatro dosis, con un promedio de 68.97% de inhibición. De manera similar, Biofungus Clean® tuvo el mismo efecto de inhibición ( $P \leq 0.0871$ ) en

**Table 3. Mycelial growth inhibition (%) of *Curvularia eragrostidis* under different doses of biological products.**

**Cuadro 3. Inhibición del crecimiento micelial (%) de *Curvularia eragrostidis* bajo diferentes dosis de productos biológicos.**

| Commercial products | Doses (%)      |                |                |                |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | 0.125          | 0.25           | 0.5            | 1.0            |
| System Max®         | 4.51 ± 0.77 d  | 5.77 ± 0.75 d  | 13.16 ± 1.78 c | 24.16 ± 1.29 e |
| Sedric 4X®          | 7.13 ± 1.22 c  | 57.48 ± 0.55 b | 68.87 ± 0.39 a | 74.96 ± 0.14 a |
| Tonka®              | 65.31 ± 0.25 a | 65.77 ± 0.62 a | 66.91 ± 0.96 a | 66.72 ± 0.61 b |
| BioFungus Clean®    | 53.47 ± 1.15 b | 47.64 ± 3.62 c | 51.57 ± 2.08 b | 56.22 ± 1.27d  |
| Blite Free®         | 53.90 ± 0.93 b | 56.30 ± 0.64 b | 52.95 ± 2.13 b | 61.45 ± 1.02 c |
| <b>P-value</b>      | 0.00001        | 0.00001        | 0.00001        | 0.00001        |
| <b>F=</b>           | 677.44         | 178.68         | 137.32         | 353.54         |

Means (± SE) with different letters in the same column indicates significant differences (LSD,  $P \leq 0.05$ ). / Medias (± ES) con diferente literal en la misma columna indica diferencias significativas (DMS,  $P \leq 0.05$ ).

inhibition effect ( $P \leq 0.0871$ ) in all concentrations with 1.2 times lower inhibition than Tonka®. BliteFree® registered the highest inhibition rate ( $P \leq 0.0002$ ) with 63.7% at the highest concentration, while lower ones between 55.8 and 58.6%. On the contrary, System Max® had a poor effect against *C. eragrostidis*, 5.1 times lower than Tonka® (0.125%). Control group had a radial mycelial growth of 7.7 cm. The results of the inhibition assays with the five products at four doses in 5 d are showed in Figure 2.

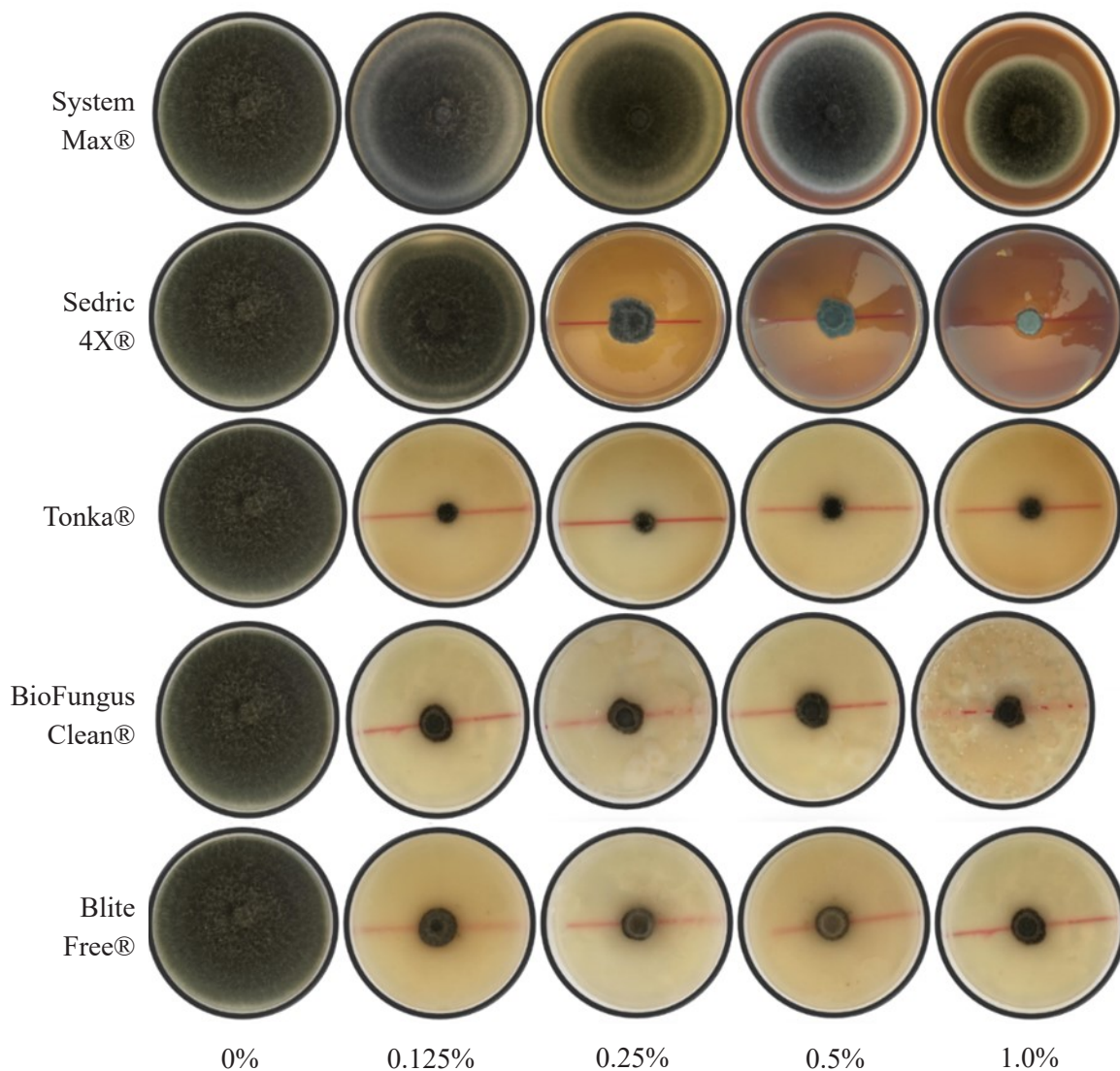
Tonka® achieves a CL<sub>50</sub> of 0.008%, which was the lowest value in comparison with the rest of the treatments, 32.2 times lower than Sedric 4X® (0.260%) and 449.8 times lower than System Max® (3.59%) (Table 4). However, BliteFree®, BioFungus Clean® also showed good values with 0.015% and 0.017%, respectively. In EC<sub>90</sub>, the best result was again for Tonka® with 0.040%, which was 9.7 times lower than BioFungus Clean® and 4.9 times lower than BliteFree®. The linear regression analysis between inhibition percentages and product doses (Figure 3) indicated a high correlation between System Max® concentrations ( $r=0.86$ ,  $P \leq 0.0001$ ) and Sedric 4X®, ( $r=0.69$ ,  $P \leq 0.0001$ ) and their inhibition percentages with highly significant differences. On the contrary, BliteFree® showed a low correlation between concentration and inhibition ( $r=0.40$ ,  $P \leq 0.0008$ ). On the other hand, Tonka® and BioFungus Clean® did not indicate a statistical difference ( $P \leq 0.1191$  and  $P \leq 0.0939$ , Table 4).

Leaf spot disease caused by *C. eragrostidis* is an emerging disease of pineapple production in Colima, Mexico (Maldonado-Michel *et al.*, 2021), the present study corroborates the identity of the causative agent morphologically and molecularly. In South America, it has been reported at *C. eragrostidis* as a plant pathogen in pineapple plants in similar features by Ferreira *et al.* (2014). In other

todas las concentraciones, con una inhibición 1.2 veces menor que Tonka®. BliteFree® registró la tasa de inhibición más alta ( $P \leq 0.0002$ ), con 63.7% a la concentración más alta, mientras que las concentraciones más bajas produjeron reducciones de 55.8 y 58.6%. En contraste, System Max® tuvo un pobre efecto contra *C. eragrostidis*, 5.1 veces menor que Tonka® (0.125%). El grupo control tuvo un crecimiento micelial radial de 7.7 cm. La Figura 2 muestra los resultados de los ensayos de inhibición con cuatro dosis de los cinco productos después de 5 días.

Tonka® logra un CL<sub>50</sub> de 0.008%, que fue el valor más bajo en comparación con el resto de los tratamientos, 32.2 veces menor que Sedric 4X® (0.260%) y 449.8 veces menor que System Max® (3.59%) (Cuadro 4). Sin embargo, BliteFree® y BioFungus Clean® también mostraron buenos valores con 0.015 y 0.017%, respectivamente. En la CE<sub>90</sub>, el mejor resultado fue nuevamente para Tonka® con 0.040%, 9.7 veces menor que BioFungus Clean® y 4.9 veces menor que BliteFree®. El análisis de regresión lineal entre los porcentajes de inhibición y las dosis del producto (Figura 3) indicó una alta correlación entre las concentraciones de System Max® ( $r=0.86$ ,  $P \leq 0.0001$ ) y Sedric 4X®, ( $r=0.69$ ,  $P \leq 0.0001$ ), y sus porcentajes de inhibición, con diferencias muy significativas. Por el contrario, BliteFree® mostró una baja correlación entre la concentración y la inhibición ( $r=0.40$ ,  $P \leq 0.0008$ ). Por otro lado, Tonka® y BioFungus Clean® no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.1191$  y  $P \leq 0.0939$ , Cuadro 4).

La enfermedad de la mancha foliar causada por *C. eragrostidis* es una enfermedad emergente de la producción de piña en Colima, México (Maldonado-Michel *et al.*, 2021). El presente estudio corrobora morfológica y molecularmente la identidad del agente causal. En América del Sur, *C. eragrostidis* ha sido reportado como patógeno vegetal en plantas



**Figure 2. Mycelial growth of *Curvularia eragrostidis* in PDA amended with five doses of biological products.**  
**Figura 2. Crecimiento micelial de *Curvularia eragrostidis* en PDA suplementado con cinco dosis de productos biológicos.**

hand, plant extracts have been used to control plant pathogens in biological and organic agriculture. La-Torre *et al.* (2014) evaluated the *in vitro* efficiency of a Mimoten®, a PB extract of *Mimosa tenuiflora* (80.0%) against *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* with a maximum inhibition of 19.2% and 14.1%, respectively, at maximum doses (1.0%). There are no reports of the use of *M. tenuiflora*

de piña por Ferreira *et al.* (2014), con características similares a las identificadas en el presente estudio. Se han utilizado extractos de plantas para controlar patógenos vegetales en agricultura biológica y orgánica. La-Torre *et al.* (2014) evaluaron la eficiencia *in vitro* de Mimoten®, un extracto de *Mimosa tenuiflora* (80.0%), contra *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*. La inhibición máxima

**Table 4. Mean effective concentration (EC<sub>50</sub>) and ninety (EC<sub>90</sub>) of biological products on *Curvularia eragrostidis*. Cuadro 4. Concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) y noventa (CE<sub>90</sub>) de productos biológicos sobre *Curvularia eragrostidis*.**

| Commercial products | EC <sub>50</sub> (%) | FL (%)       | Slope  | Probit equation       | Chi-X <sup>2</sup> | P>Chi-X <sup>2</sup> |
|---------------------|----------------------|--------------|--------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| System Max®         | 3.599                | 2.32-7.01    | 0.8070 | y=0.8070(x)-0.4485    | 85.51              | ≤0.0001              |
| Sedric 4X®          | 0.260                | 0.24-0.27    | 2.2153 | y=2.2153(x)+1.2974    | 536.62             | ≤0.0001              |
| Tonka®              | 0.008                | NC           | 0.0650 | y=0.0650(x)+0.5264    | 121.15             | ≤0.0001              |
| BioFungus Clean®    | 0.017                | NC           | 0.0921 | y=0.0921 (x)+0.1631   | 12.70              | ≤0.0004              |
| BliteFree®          | 0.015                | NC           | 0.1579 | y=0.1579 (x)+0.2876   | 38.79              | ≤0.0001              |
| Commercial products | EC <sub>90</sub> (%) | FL (%)       | Slope  | Probit equation       | Chi-X <sup>2</sup> | P>Chi-X <sup>2</sup> |
| System Max®         | 139.405              | 47.22-758.51 | 0.8070 | y=0.8070(x)+(-0.4485) | 85.51              | ≤0.0001              |
| Sedric 4X®          | 0.984                | 0.885-1.110  | 2.2153 | y=2.2153(x)+1.2974    | 536.62             | ≤0.0001              |
| Tonka®              | 0.040                | NC           | 0.0650 | y=0.0650(x)+0.5264    | 121.15             | ≤0.0001              |
| BioFungus Clean®    | 0.388                | NC           | 0.0921 | y=0.0921 (x)+0.1631   | 12.70              | ≤0.0004              |
| BliteFree®          | 0.197                | NC           | 0.1579 | y=0.1579 (x)+0.2876   | 38.79              | ≤0.0001              |

FL=fiducial limits, NC=no estimated by the model, X=biological product concentration, Y=inhibition percentage.  
/ LF=limites fiduciales, NC=no estimado por el modelo, X=concentración del producto biológico, Y=porcentaje de inhibición. .

against *C. eragrostidis*; in this case, System Max® contains *M. tenuiflora*, but it is supplemented with *Quercus* sp. extract and gallic acid, which increased the inhibition up to 34.6%. *Quercus* extracts have been tested as antibacterial and antifungal activity, in this sense, Söhretoglu *et al.* (2007) tested methanolic extracts from four *Quercus* species, against gram (+) and (-) bacteria and three *Candida* spp. Extracts were more effective against fungi than bacteria. In filamentous fungi, Yeo *et al.* 2008 tested *Q. mongolica* in aqueous, methanolic and ethanolic extracts against *Botrytis cinerea*, being the aqueous extract more effective. Gallic acid and other phenolic compounds have been tested as an antifungal for human and plant pathogens.

In *Trichophyton rubrum*, gallic acid (50.0 µg mL<sup>-1</sup>) reduced the activity of sterol 14α-demethylase P450 (CYP51) and squalene epoxidase altering the fungal membrane (Li *et al.*, 2017). In the present study, Sedric 4X®, PB extract of *Y. schidigera* showed 86% of inhibition at the highest concentration. Wulff *et al.* (2012) evaluated

obtenida fue de 19.2% y 14.1%, respectivamente, a dosis máximas (1.0%). No hay reportes del uso de *M. tenuiflora* contra *C. eragrostidis*. System Max®, usado en el presente estudio, contiene *M. tenuiflora*, pero complementado con extracto de *Quercus* sp. y ácido gálico, lo que aumentó la inhibición hasta 34.6%. La actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *Quercus* han sido probados antes. Söhretoglu *et al.* (2007) probaron extractos metanólicos de cuatro especies de *Quercus* contra bacterias gram (+) y (-) y tres bacterias *Candida* spp. Los extractos fueron más efectivos contra los hongos que contra las bacterias. En hongos filamentosos, Yeo *et al.* (2008) probaron *Q. mongolica* en extractos acuosos, metanólicos y etanólicos contra *Botrytis cinerea*, siendo el extracto acuoso más efectivo. El ácido gálico y otros compuestos fenólicos se han probado como antifúngicos contra patógenos humanos y vegetales.

En *Trichophyton rubrum*, el ácido gálico (50.0 µg mL<sup>-1</sup>) redujo la actividad de la enzima estero 14α-desmetilasa P450 (CYP51) y de la enzima



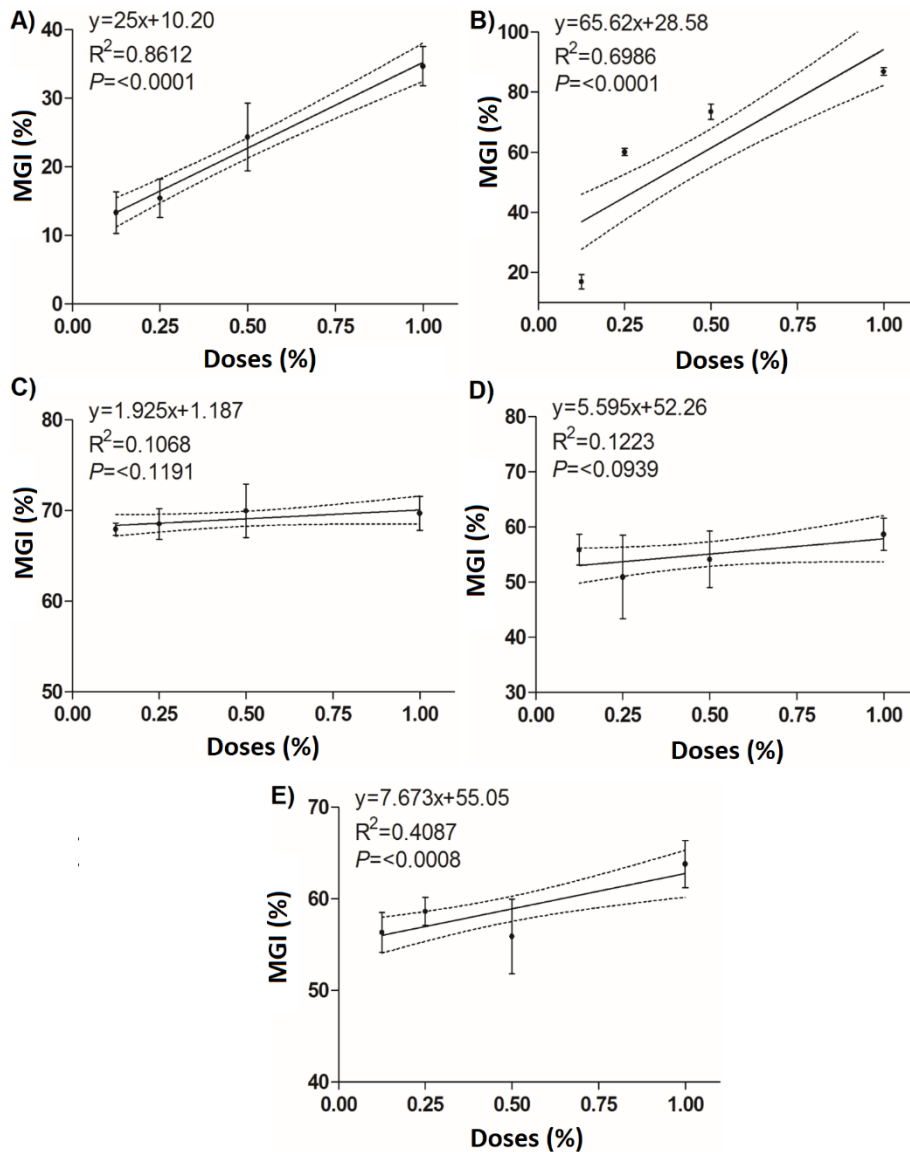


Figure 3. Linear regression between the mycelial growth inhibition (%) of *Curvularia eragrostidis* and the doses of the biological products. A) System Max®; B) Sedric 4X®; C) Tonka®; D) BioFungus Clean® and E) BliteFree®.

Figura 3. Regresión lineal entre la inhibición del crecimiento micelial (%) de *Curvularia eragrostidis* y las dosis de los productos biológicos. A) Sistema Max®; B) Sedric 4X®; C) Tonka®; D) BioFungus Clean® y E) BliteFree®.

the effect of *Y. schidigera* extract against *C. lunata* from sorghum, no incidence (0%) was achieved when was used 10.0% (v/v) of *Y. schidigera* extract. These plants are rich in saponins, which can alter the cell membranes having a toxic effect on fungi. Maldonado-Michel *et al.* (2021) tested hexane,

escualeno epoxidasa, alterando la membrana fúngica (Li *et al.*, 2017). En el presente estudio, Sedric 4X®, extracto de *Y. schidigera* mostró 86% de inhibición en la concentración más alta. Wulff *et al.* (2012) evaluaron el efecto del extracto de *Y. schidigera* contra *C. lunata* de sorgo, no se



ethyl acetate dichloromethane and methanol PE of *Swietenia humilis* against this isolate of *C. eragrostidis*, being the ethyl-acetate at 500 mg L<sup>-1</sup> the most effective with 68.0% of MGI. The main secondary metabolites of *S. humilis* are limonoids, a kind of triterpenoids that are found in the seeds (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015).

A complete inhibition (100.0%) of spore germination of *C. lunata* using *Cinnamomum zeylanicum* organic extracts at lowest concentration (50 µg mL<sup>-1</sup>) and a complete fungicidal activity at highest concentration (500 µg mL<sup>-1</sup>), but aqueous extracts were not efficient (Mishra *et al.*, 2009). Otherwise, Akinbode (2010) evaluated *in vitro* the efficacy of leaf aqueous extracts of *Gliricidia sepium*, *Tithonia diversifolia*, *Phyllanthus amarus* and *Morinda lucida* to control *C. lunata*. All the extracts at 100% concentration, suppressed the growth of the pathogen.

In the other hand, BliteFree® achieved 55.6-67.7% inhibition against *C. eragrostidis*. These results are similar to those reported by Evangelista-Martínez (2014), who evaluated *Streptomyces* spp. against *Curvularia* sp. with a 55.0% of plant-pathogen growth inhibition. Wonglom *et al.* (2019) confronted *C. lunata* isolated from *Brassica rapa* with *S. angustmyceticus* (NR8-2) with inhibition of 69.0%. Some of the antagonism mechanisms of *Trichoderma* spp. against plant pathogens include antibiosis, mycoparasitism, induced resistance of the host cell, nutrient and niche competition (Ghazanfar *et al.*, 2018). Tekade *et al.* (2017) evaluated *T. viride* and *T. harzianum* against *C. lunata*, presenting 60.8 and 50.7% of inhibition, respectively, in 7 d at 27 °C. These results are similar to BioFungus Clean® which caused 54.8% inhibition in 5 d against *C. eragrostidis*. *Bacillus* spp. is one of the most studied genera as BCA since they present a diverse biochemical activity against plant pathogens (Layton *et al.*, 2011). It

logró inhibición (0%) cuando se utilizó una concentración de 10.0% (v/v) del extracto de *Y. schi-digera*. Estas plantas son ricas en saponinas, que pueden alterar las membranas celulares y tienen un efecto tóxico sobre los hongos. Maldonado-Michel *et al.* (2021) probaron hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol para extractos de *Swietenia humilis* contra este aislado de *C. eragrostidis*, siendo el acetato de etilo, a 500 mg L<sup>-1</sup>, el más efectivo con 68.0% de ICM. Los principales metabolitos secundarios de *S. humilis* son los limonoides, un tipo de triterpenoides que se encuentran en las semillas (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015).

Se ha reportado la inhibición completa (100.0%) de la germinación de esporas de *C. lunata* usando extractos orgánicos de *Cinnamomum zeylanicum* a la concentración más baja (50 µg mL<sup>-1</sup>) y actividad fungicida completa a la concentración más alta (500 µg mL<sup>-1</sup>), pero los extractos acuosos no fueron eficientes (Mishra *et al.*, 2009). Por otro lado, Akinbode (2010) evaluó *in vitro* la eficacia de extractos acuosos de hojas de *Gliricidia sepium*, *Tithonia diversifolia*, *Phyllanthus amarus* y *Morinda lucida* para controlar *C. lunata*. Al 100% de concentración, todos los extractos suprimieron el crecimiento del patógeno.

Por otro lado, BliteFree® logró una inhibición de 55.6-67.7% contra *C. eragrostidis*. Estos resultados son similares a los reportados por Evangelista-Martínez (2014), quien evaluó *Streptomyces* spp. contra *Curvularia* sp., logrando un 55.0% de inhibición del crecimiento del patógeno vegetal. Wonglom *et al.* (2019) confrontaron *C. lunata* aislada de *Brassica rapa* con *S. angustmyceticus* (NR8-2), logrando una inhibición del 69.0%. Los mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra patógenos vegetales incluyen antibiosis, micoparasitismo, resistencia inducida de la célula huésped, competencia por nutrientes y nicho (Ghazanfar *et al.*, 2018). Tekade *et al.* (2017) evaluaron

has been reported that *Bacillus* spp. induces cell membrane defects and cell death in fungal hyphae, when the cell membrane is destroyed the nucleus and protoplast are exuded. Among the secondary metabolites secreted by *Bacillus* spp. has been reported antimicrobial proteins with active components such as paeonol, ethyl palmitate and oxalic acid, which are able to inhibit the sporulation and mycelial growth in fungal plant pathogens (Ku *et al.*, 2021).

Basha and Ulaganathan (2002) evaluated BC121, a chitinase producer *Bacillus* strain against *C. lunata*, with inhibition up to 60.0%. Scanning electron microscope images showed a clear hyphae lysis and degradation of fungal wall. Orberá-Ratón *et al.* (2012) tested five rhizosphere isolates of *B. subtilis* against *C. lunata* with inhibition up to 61.0% (SR/A-1) and *Curvularia gudauskasii* with inhibition up to 71.0% (SR/B-16), and observed vacuolization, bulb formation, hyphal swelling, growing and conidia formation inhibition. However, other strains show different results. For example, Fleitas-Centurion and Grabowsky-Ocampos (2015) evaluated a *Bacillus* sp. (500 uL) against *Curvularia* sp. with 31.0% of inhibition. These previously reported values are heterogeneous, as occurred with BioFungus Clean® and Tonka®.

Sunpapao *et al.* (2018) confronted *C. oryzae* against *S. hygroscopicus*, *T. harzianum* and an endophytic *Trichoderma* species (V76-12), the latter was the most effective treatment tested in reducing leaf spot disease of oil palm seedlings with 85.71% of MGI. The formulation of Tonka® consists of three species consortia: a fungus (*T. harzianum*), a *Bacillus* species (*B. subtilis*), and an actinobacteria (*S. lydicus*). These results are interesting, because BioFungus Clean® has four species, two bacteria (*B. subtilis* and *B. thuringiensis*) and two fungi (*T. harzianum* and *T. viride*), this situation suggest that is more efficient a higher phylogenetic, biochemical and ecological

*T. viride* y *T. harzianum* contra *C. lunata*, logrando 60.8 y 50.7% de inhibición, respectivamente, en 7 días a 27 °C. Estos resultados son similares a los obtenidos con BioFungus Clean®, que provocó una inhibición del 54.8% contra *C. eragrostidis* después de 5 días. *Bacillus* spp. es uno de los géneros más estudiados como ACB ya que las presencias que comprende presentan una actividad bioquímica diversa contra patógenos de plantas (Layton *et al.*, 2011). Se ha informado que *Bacillus* spp. induce defectos en la membrana celular y muerte celular en las hifas fúngicas, cuando la membrana celular se destruye, el núcleo y el protoplasto se exudan. Entre los metabolitos secundarios secretados por *Bacillus* spp., se han reportado proteínas antimicrobianas con componentes activos como paeonol, palmitato de etilo y ácido oxálico, que son capaces de inhibir la esporulación y el crecimiento micelial en hongos patógenos de plantas (Ku *et al.*, 2021).

Basha y Ulaganathan (2002) evaluaron la cepa BC121 de *Bacillus*, productora de quitinasa, contra *C. lunata*, registrando una inhibición de hasta 60.0%. Las imágenes del microscopio electrónico de barrido mostraron una clara lisis de hifas y degradación de la pared fúngica. Orberá-Ratón *et al.* (2012) probaron cinco aislados de rizosfera de *B. subtilis* contra *C. lunata*, registrando una inhibición de hasta 61.0% (SR/A-1), y contra *Curvularia gudauskasii*, logrando una inhibición de hasta 71.0% (SR/B-16). Los autores observaron vacuolización, formación de bulbos, hinchazón de hifas, crecimiento e inhibición de la formación de conidios. Sin embargo, otras cepas han mostrado resultados diferentes. Por ejemplo, Fleitas-Centurion y Grabowsky-Ocampos (2015) evaluaron *Bacillus* sp. (500 uL) contra *Curvularia* sp., registrando 31.0% de inhibición. Los valores reportados anteriormente son heterogéneos, como ocurrió en el presente estudio con BioFungus Clean® y Tonka®.

Sunpapao *et al.* (2018) enfrentaron a *C. oryzae* contra *S. hygroscopicus*, *T. harzianum* y una espe-

diverse composition than a high number of close-related microorganisms. This is coherent with the concept of suppressive soils, on which plant diseases do not develop even with the presence of a plant pathogen in a susceptible host and favorable conditions. Pathogens may or not establish, persist, cause no or low harm, or the disease may manifest but disappear over time, which is widely attributed to soil microbiomes. General suppression depends on a high diversity and abundance of microorganisms, competing for space and resources; while specific suppression on the effect of individuals or groups of microorganisms directly over the life cycle of a pathogen (Raaijmakers and Mazola, 2016).

Research of microorganisms with BCA potential is challenging because the *in vitro* behavior might be promising, but the application in agricultural lands results in fluctuations of effectiveness. Production of metabolites is a common phenomenon in antagonistic relationships; however, their synthesis carries an energetic cost, which must be compensated with the benefits and can be influenced by toxic substances and the proportion of strains. For example, bacterial antagonism rises with carbon source metabolism similarities (Russel *et al.*, 2017). We can differentiate microorganisms into productive and sensitive strains, which interact according to microbial diversity and their environment (Kelsic *et al.*, 2015). Production of metabolites and their related processes decreases the growth rate. Despite this, productive strains rise compared to sensitive ones, even with low growth rates. The carbon source is not a problem when strains are grown *in vitro*; however, in agricultural lands, organic matter fluctuates according to soil type and management. Also, the use of fungicides and bactericides affected native microorganisms and added BCA and their performance. In addition to studying the diversity of soil microorganisms to develop biological products; another alternative is

cie endofítica de *Trichoderma* (V76-12). Este fue el tratamiento más efectivo para reducir la mancha foliar de plántulas de palma aceitera, con 85.71% de ICM. La formulación de Tonka® consta de tres consorcios de especies: un hongo (*T. harzianum*), una especie de *Bacillus* (*B. subtilis*) y una actinobacteria (*S. lydicus*). Estos resultados son interesantes, ya que BioFungus Clean® tiene cuatro especies, dos bacterias (*B. subtilis* y *B. thuringiensis*) y dos hongos (*T. harzianum* y *T. viride*). Esta situación sugiere que es más eficiente una composición más diversa en términos filogenéticos, bioquímicos y ecológicos que un alto número de microorganismos estrechamente relacionados. Esto es coherente con el concepto de suelos supresores, en los que las enfermedades de las plantas no se desarrollan incluso con la presencia de un patógeno vegetal en un huésped susceptible y en condiciones favorables. Los patógenos pueden o no establecerse, persistir, causar poco o ningún daño, o la enfermedad puede manifestarse, pero desaparecer con el tiempo, lo que se atribuye ampliamente a los microbiomas del suelo. La supresión general depende de una gran diversidad y abundancia de microorganismos compitiendo por espacio y recursos, mientras que la supresión específica depende del efecto directo de individuos o grupos de microorganismos sobre el ciclo de vida de un patógeno (Raaijmakers y Mazola, 2016).

La investigación de microorganismos con potencial como ACB es un desafío porque el comportamiento *in vitro* puede ser prometedor, pero la aplicación en tierras agrícolas da como resultado fluctuaciones en la efectividad. La producción de metabolitos es un fenómeno común en las relaciones antagónicas. Sin embargo, su síntesis conlleva un costo energético que debe ser compensado con los beneficios y que puede ser influenciado por sustancias tóxicas y la proporción de cepas. Por ejemplo, el antagonismo bacteriano aumenta con

the design of synthetic microorganism communities or “syncoms”. This highly diverse consortium results closer to a natural community, with higher complexity and resilience (Rábago-Aguilar *et al.*, 2020). By other hand, this study provides the  $LC_{50}$  values for five biofungicides against *C. eragrostidis*,  $LC_{50}$  indicates the amount of biofungicide required to inhibit the 50% of fungal growth. There are no abundant reports of biological or biorational products with respect to the  $LC_{50}$  against *Curvularia* species. Therefore, the present study provides these values, which are useful to define doses to be evaluated under *in situ* conditions. In a previous study, Kumar *et al.* (2020) evaluated the antifungal activity of *Cedrus deodara* essential oil against *C. lunata*, *Alternaria alternata* and *Bipolaris spicifera*, reporting  $LC_{50}$  values of 2.22, 3.71 and 4.8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  for each fungus, respectively. By other hand, García-Ordaz *et al.* (2021) reported  $LC_{50}$  values of chemical fungicides against *C. eragrostidis*, the lowest values were achieved by System Cu®, Mancozeb® 80 WP and Tecto® 60 with 0.024, 0.066 and 0.076%, respectively. Future studies should be carried out to test the  $LC_{50}$  under field conditions in pineapple production.

In conclusion, the associated fungus to the leaf spot disease in pineapple plants corresponded at *Curvularia eragrostidis* according to the morphological and molecular analyses. Tonka® was the better biofungicide against *C. eragrostidis*, according to the  $EC_{50}$ . While, Sedric 4X® achieved the highest% of MGI at the highest studied doses (1.0%).

## LITERATURE CITED

Akinbode OA. 2010. Evaluation of antifungal efficacy of some plant extracts on *Curvularia lunata*, the causal organism of maize leaf spot. African Journal of Environmental Science and Technology 4(11):797-800. <https://doi.org/10.4314/ajest.v4i11.71351>

las similitudes del metabolismo de la fuente de carbono (Russel *et al.*, 2017). Podemos diferenciar los microorganismos en cepas productivas y sensibles que interactúan según la diversidad microbiana y su entorno (Kelsic *et al.*, 2015). La producción de metabolitos y sus procesos relacionados disminuyen la tasa de crecimiento. A pesar de ello, las cepas productivas aumentan frente a las sensibles, incluso con bajas tasas de crecimiento. La fuente de carbono no es un problema cuando las cepas se cultivan *in vitro*. Sin embargo, en las tierras agrícolas la materia orgánica fluctúa según el tipo de suelo y de su manejo. Asimismo, el uso de fungicidas y bactericidas afecta a los microorganismos nativos. Además de estudiar la diversidad de microorganismos del suelo para desarrollar productos biológicos, otra alternativa es el diseño de comunidades sintéticas de microorganismos “syncoms”. Estos consorcios altamente diversos resultan más cercanos a las comunidades naturales, con mayor complejidad y resiliencia (Rábago-Aguilar *et al.*, 2020).

El presente estudio proporciona los valores de  $CE_{50}$  de cinco biofungicidas contra *C. eragrostidis*. Los valores de  $CE_{50}$  indican la cantidad de biofungicida requerida para inhibir el 50% del crecimiento fúngico. No existen muchos reportes de la  $CE_{50}$  de productos biológicos o biorracionales contra especies de *Curvularia*. El presente estudio proporciona estos valores, que son útiles para definir las dosis a evaluar en condiciones *in situ*. En un estudio previo, Kumar *et al.* (2020) evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *Cedrus deodara* contra *C. lunata*, *Alternaria alternata* y *Bipolaris spicifera*, reportando valores de  $EC_{50}$  de 2.22, 3.71 y 4.8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para cada hongo, respectivamente. Por su parte, García-Ordaz *et al.* (2021) reportaron los valores de  $CE_{50}$  de fungicidas químicos contra *C. eragrostidis*. Los valores más bajos se registraron con System Cu®, Mancozeb® 80 WP y



- Bahekar AM, Ingle RW and Kendre VP. 2017. Efficacy of fungicides and bioagent against fungal pathogens of *Aloe vera*. International Journal of Chemistry Studies 5(4):1540-1543. <https://www.chemjournal.com/archives/?year=2017&vol=5&issue=4&ArticleId=845>
- Basha S and Ulaganathan K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current Science 82(12):1457-1463. <https://www.jstor.org/stable/24106181>
- Cerqueira-Sales MD, Barcellos-Costa H, Fernandes PMB, Aires-Ventura J and Dummer-Meira D. 2016. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6 (1):26-31. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.026>
- Evangelista-Martínez Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30(5):1639-1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Ferreira APS, Pinho DB, Machado AR and Pereira OL. 2014. First report of *Curvularia eragrostidis* causing postharvest rot on pineapple in Brazil. Plant Disease 98(9):1277-1277. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0288-PDN>
- Fleitas-Centurión A y Grabowski-Ocampos CJ. 2015. Control biológico del complejo de hongos causantes de la mancha foliar en maíz dulce (*Zea mays* var. *saccharata*) con bacterias benéficas. Investigación Agraria 16(2): 83-92. [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2305-06832014000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2305-06832014000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- García-Osorio MS y Orozco-Gómez BA. 2016. Etiología de enfermedades en el cultivo de piña (*Ananas comosus* L. cv. Monte lirio) y pruebas de antagonismo “*in vitro*” con *Trichoderma*. Master Thesis, Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. 51 pp.
- Ghazanfar MU, Raza M, Raza W and Qamar MI. 2018. *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture. Plant Protection 2(3):109-135. <https://esciencepress.net/journals/index.php/PP/article/view/3142/1571>
- Heydari A and Pesarakli M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. Journal of Biological Science 10(4): 273-290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- INEGI (2019). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2019. <https://www.inegi.org.mx>. Accessed: May 5, 2021.
- Kelsic ED, Zhao J, Vetsigian K and Kishony R. 2015. Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. Nature 521(7553): 516-519. <https://doi.org/10.1038/nature14485>
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16(2):111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Tecto® 60 con 0.024, 0.066 y 0.076%, respectivamente. Se deben realizar más estudios para probar la CE<sub>50</sub> en condiciones de campo en la producción de piña.
- En conclusión, el hongo asociado a la enfermedad de la mancha foliar en plantas de piña correspondió a *Curvularia eragrostidis* según los análisis morfológicos y moleculares. Tonka® fue el mejor biofungicida contra *C. eragrostidis*, según la CE<sub>50</sub>. Mientras que Sedric 4X® logró el mayor% de ICM en la dosis más alta estudiada (1.0%).

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

- Kumar A, Suravajhala R and Bhagat M. 2020. Bioactive potential of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud essential oil (bark) against *Curvularia lunata* and molecular docking studies. SN Applied Sciences 2:1045. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2837-6>
- Ku Y, Yang N, Pu P, Mei X, Cao L, Yang X and Cao C. 2021. Biocontrol mechanism of *Bacillus subtilis* C3 against bulb rot disease in *Fritillaria taipaiensis* P.Y.Li. Frontiers in Microbiology 12:756329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756329>
- La-Torre A, Caradonia F, Gianferro M, Molinu MG and Battaglia V. 2014. Activity of natural products against some phytopathogenic fungi. Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences 79(3):439-449. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26080478/>
- Layton C, Maldonado E, Monroy L, Corrales LC, Sánchez LC. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. NOVA 9(15):177-187. <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- Li ZJ, Liu M, Dawuti G, Dou Q, Ma Y, Liu HG and Aibai S. 2017. Antifungal activity of gallic acid *in vitro* and *in vivo*. Phytotherapy Research 31(7):1039-1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.5823>
- Maldonado-Michel MA, Muñiz-Valencia R, Peraza-Campos AL, Ramos RCP, Valadez-Ramírez P, Parra-Delgado H and Chan-Cupul W. 2021. Antifungal activity of *Swietenia humilis* (Meliaceae: Sapindales) seed extracts against *Curvularia eragrostidis* (Ascomycota: Dothideomycetes). Journal of Plant Disease and Protection 128:471-479. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00410-1>
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EH, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP and Hyde KD.

2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 56(1):131-144. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>
- Manzo-Sánchez G, Ocón-Pérez R, Chan-Cupul W, Silva-Jiménez E, Sánchez-Rangel JC y Ayala-Zermeño MA. 2018. Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio *in vitro*. *Scientia Fungorum* 47:13-24. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.47.1189>
- Mishra AK, Mishra A, Kehri HK, Sharma B and Pandey AK. 2009. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8(1):1-7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-9>
- García-Ordaz HA, Chan-Cupul W, Buenrostro-Nava MT and Valadez-Ramírez P. 2021. Efectividad *in vitro* de fungicidas químicos contra *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J. A. Mey, agente causal de la mancha foliar en piña. *Scientia Agropecuaria* 12(3):429-434. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.047>
- Orberá-Ratón T, González-Giro Z, Serrat-Díaz M and Rodríguez-Pérez S. 2012. *In vitro* growth inhibition of *Curvularia gudauskasii* by *Bacillus subtilis*. *Annals of Microbiology* 62(2):545-551. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0290-x>
- Orberá-Ratón T, Serrat-Díaz M y González-Giro Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad* 13:95-100. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0290-x>
- Orozco-Santos M, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Fariás-Larios J y Timmer LW. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(3):423-428. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222316.pdf>
- Ovalle-Magallanes B, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J and Mata R. 2015. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 110:111-119. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.004>
- Raaijmakers JM and Mazzola M. 2016. Soil immune responses. *Science* 352(6292):1392-1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3252>
- Rábago-Aguilar J, Hernández-Navarro E y Sepúlveda-Sánchez HE. 2020. Suelos supresores: ecología microbiana para el control de enfermedades en plantas. In: Orozco-Mosqueda MC y Santoyo-Pizano G (eds.) *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Aspectos básicos y aplicaciones para una agricultura sustentable*. 1st ed. Fontamara, México. 131-148 pp.
- Rocha-Santos PR, Urzêdo-Leão E, Souza-Aguiar RW, Pereira-Melo M and Rodrigues-Santos G. 2018. Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. *Bragantia* 77(2):326-332. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017258>
- Russel J, Roder HL, Madsen JS, Burmolle M, Sorensen SJ. 2017. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(40):10684-10688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706016114>
- Sanewski GM, Bartholomew DP and Paull RE. 2018. The pineapple: botany, production and uses. CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851995038.0000>
- Söhretoglu D, Ekizoglu M, Kiliç E and Sakar MK. 2007. Antibacterial and antifungal activities of some *Quercus* species growing in Turkey. *FABAD Journal of Pharmacy Science* 32(3):127-130. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/2253125>
- Sunpapao A, Chairin T and Ito SI. 2018. The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. *Biological Control* 123:36-42. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.017>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst19>
- Tan YP, Crous PW and Shivas RG. 2018. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycKeys* 35(11):1-25. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25665>
- Tekade A, Koche MD, Kothikar RB and Surpam AN. 2017. Efficacy of fungicides and bioagents against *Curvularia lunata* causing blight of coleus under laboratory conditions. *Journal of Medicinal Plants Studies* 5(2):189-191. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17611.13600>
- Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG. 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics* 2.3.1-2.3.22. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: MA Innis, DH Gelfand, J Sninsky, TJ White (Eds.). *PCR protocols, a guide to methods and applications* San Diego, California, E.U.A., Academic Press. pp. 315-322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wonglom P, Suwannarach N, Lumyong S, Ito SI, Matsui K and Sunpapao A. 2019. *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 as a potential microorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp. and *Curvularia lunata*. *Biological Control* 138:104046. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104046>

- Wulff EG, Zida E, Torp J and Lund OS. 2012. *Yucca schidigera* extract: a potential biofungicide against seedborne pathogens of sorghum. *Plant Pathology* 61(2):331-338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02517.x>
- Yeo HD, Lee HC, Lim BK, Kim HK, Choi MS and Yang JK. 2008. Antifungal activity of the *Quercus mongolica* extracts against *Botrytis cinerea*. *Journal of the Korean Wood Science and Technology* 36(1):88-101. <https://doi.org/10.5658/WOOD.2008.36.1.088>.
- Zhong LC, Ai YJ, Chun RH and Yi YD. 2016. Identification of *Curvularia clavata* causing leaf spot on pineapple (*Ananas comosus*) in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38(2):250-253. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1158743>.

Associated pathogens to the regressive death of Canary palm (*Phoenix canariensis*) at urban areas of Queretaro, Mexico

Patógenos asociados a la muerte regresiva de la palma canariense (*Phoenix canariensis*) en áreas urbanas de Querétaro, México

Santiago Vergara-Pineda*, Fidel Landeros-Jaime, Guadalupe Malda-Barrera, Hilda Huerta-Cantera, Ulises Esquivel-Naranjo, Kruskaia Caltzonzin-Fernández, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Queretaro, Av. de las Ciencias S/N Juriquilla, Santa Rosa Jáuregui, Qro. CP.76230; Juan Ramiro Pacheco-Aguilar, Facultad de Química, Centro Universitario, Cerro de las Campanas S/N, C. P. 76010.

*Corresponding author: santiago.vergara@uaq.mx.

Received: July 10, 2022.

Accepted: December 15, 2022.

Vergara-Pineda S, Landeros-Jaime F, Malda-Barrera G, Huerta-Cantera H, Esquivel-Naranjo U, Caltzonzin-Fernández K and Pacheco-Aguilar JR. 2023. Associated pathogens to the regressive death of Canary palm (*Phoenix canariensis*) at urban areas of Queretaro, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 112-125.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-4>

First DOI publication: December 27, 2022.

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2022.

Abstract. The Canarian palm *Phoenix canariensis* palm has been severely affected during the past decade with high mortality of specimens of all ages in the metropolitan area of Queretaro, Mexico. The aim of this work was to determine the causal agent associated with the regressive death of *P. canariensis* in Santiago de Queretaro City. Therefore, inspections were made in order to find specimens with disease symptoms, and from the

Resumen. La palma canariense (*Phoenix canariensis*) se ha visto severamente afectada durante la década pasada con alta mortalidad de ejemplares de todas las edades en la ciudad de Querétaro, México. El objetivo de este trabajo fue determinar los agentes causales asociados a la muerte regresiva de *P. canariensis* en la ciudad de Santiago de Querétaro. Se realizaron recorridos en la zona conurbada para identificar palmas con síntomas, y de las muestras de meristemo apical y raquis de hojas, trozos de tejido fueron colocados en cámaras húmedas para promover el desarrollo de hongos y bacterias. A partir de un aislamiento se realizó las pruebas de patogenicidad. En total 262 palmas fueron muestreadas: 95 asintomáticas (36.3%), 122 plantas muertas (46.6%) y 45 plantas con síntomas (17.2%) asociados a hojas basales muertas y hoja bandera muerta. De 12 palmas, se identificaron molecularmente *Fusarium* spp. (del complejo *F. incarnatum* y *F. verticillioides*). En el caso de *F. solani*, la patogenicidad fue confirmada en palmas de dos años. De acuerdo con las características

samples of rachis and apical meristem, pieces of tissue were left in wet chambers in order to promote of fungi and bacteria. A pathogenicity test from one isolate was done. A total of 262 palm trees were sampled: 95 without symptoms (36.3%), 122 death palms (46.6%) and 45 diseased (17.2%) with basal leaves death and flag leaf death. From 12 palms, *Fusarium* spp. (from the complex *F. incarnatum* and *F. verticillioides*) was molecularly identified. According to the morphological characteristics *Erwinia* sp. and *F. solani* were identified and with the last one pathogenicity test performed on two-year-old palms. Also, the lethal yellowing disease was identified since an apical meristem sample was sent to the National Phytosanitary Reference Center. The results showed the presence of a complex of pathogens associated with the regressive death of *P. canariensis*.

Keywords: canary palm, pathogenic complex, syndrome, *Fusarium* spp.

The Phoenix palm or Canarian palm (*Phoenix canariensis*) is native to the Canary Islands (archipelago of Spain) and can reach 12 to 15 m in height (Broschat, 2013). It was widely introduced in several countries and is one of the most cultivated and appreciated ornamental species in the world (CABI, 2016). One of the main sanitary problems that affects this species is wilt, which has been documented in several countries around the world. In France (1973), the causal agent was identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*; Likewise, it was reported in Italy, Japan (1977) (Arai and Yamamoto, 1977; Feather *et al.*, 1979), the Canary Islands and California. In this last place it has been reported in palms planted in fields and in nurseries in Florida (Garofalo and McMillan, 2003). In the case of Italy, the presence of *Phytophthora*

morfológicas se identificó a *Erwinia* sp. También se identificó al amarillamiento letal del cocotero en una muestra enviada al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Los resultados mostraron la presencia de un complejo de patógenos asociados a la muerte regresiva de *P. canariensis*.

Palabras clave: palma canariense, complejo de patógenos, síndrome, *Fusarium* spp.

La palma fénix o palma canariense (*Phoenix canariensis*) es nativa de las Islas Canarias (archipiélago de España) y puede alcanzar de 12 a 15 m de altura (Broschat, 2013). Se introdujo ampliamente a varios países y es una de las especies ornamentales comúnmente cultivadas y apreciadas en el mundo (CABI, 2016). Uno de los problemas sanitarios que principalmente afecta a esta especie es la marchitez, la cual se ha documentado en varios países alrededor del mundo, en Francia (1973), el agente causal fue identificado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*; así mismo, se reportó en Italia, Japón (1977) (Arai y Yamamoto, 1977; Feather *et al.*, 1979), Islas Canarias y California. En este último lugar se ha reportado en palmas sembradas en campos y en viveros de Florida (Garofalo y McMillan, 2003). En el caso de Italia se ha documentado la presencia de *Phytophthora palmivora* como agente causal de la pudrición de cogollo de la palma canariense (Pane *et al.*, 2007).

Garofalo y McMillan (1999) indicaron, que la pudrición del cogollo es causada por *Phytophthora* sp., uno de los patógenos más comunes de las palmas que se encuentran en el trópico húmedo; y mencionan que entre las especies susceptibles se encuentra *P. canariensis*. Otras especies de hongos que se han registrado como causantes de la pudrición del brote en las palmas, a menudo como infecciones secundarias en las últimas etapas de desarrollo

palmivora has been documented as the causal agent of bud rot of the Canarian palm (Pane *et al.*, 2007).

Garofalo and McMillan (1999) indicated that bud rot is caused by *Phytophthora* sp., one of the most common pathogens of palms found in the humid tropics; and mention that among the susceptible species is *P. canariensis*. Other fungal species that have been reported to cause bud rot in palms, often as secondary infections late in disease development or just before palm death, include the genera *Botryodiplodia*, *Chalara* (*Thielaviopsis*) and *Colletotrichum*.

In America, this disease has spread to Panama, Costa Rica, Nicaragua, Ecuador, Brazil, Suriname, Peru and Venezuela (Franqueville, 2001). In the case of Mexico, according to information provided by Romero-Valencia (Personal comm. 2019), in the city of Santiago de Queretaro, the regressive death of the palm began to be observed since 2009, with precedents in Guanajuato; however, the causative agent has not been studied. The dieback of the Canarian palm has spread rapidly in the city of Santiago de Queretaro, killing dozens of palms in avenues, public parks, institutions, and private gardens, affecting specimens aged from four to more than 80 years according to records from the owners, regardless of the type of management. Due to the variation of the pathogens that have been found in different studies and places around the world, the objective of this work was to determine the causal agent(s) associated with the dieback of the Canariense palm (*P. canariensis*) in the metropolitan area of Santiago de Queretaro, Queretaro.

The study area was the city of Queretaro and surroundings, which includes the municipalities of Queretaro, El Marques and Corregidora. It was divided into four quadrants, taking the central zone as the midpoint and magnetic north as the reference. During the investigation, tours were carried out (September 2014 to August 2015) in the

de la enfermedad o justo antes de la muerte de la palma, son los géneros *Botryodiplodia*, *Chalara* (*Thielaviopsis*) y *Colletotrichum*.

En América, la enfermedad se ha extendido en Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Ecuador, Brasil, Surinam, Perú y Venezuela (Franqueville, 2001). En el caso particular de México, de acuerdo con información proporcionada por Romero-Valencia (com. Personal 2019), en la ciudad de Santiago de Querétaro, la muerte regresiva de la palma se empezó a observar desde 2009, con antecedentes en Guanajuato; sin embargo, no se ha estudiado al agente causal. La muerte regresiva de la palma canariense se ha dispersado rápidamente en la ciudad de Santiago de Querétaro, matando decenas de palmas en avenidas, parques públicos, instituciones, jardines privados, afectando ejemplares con edades desde los cuatro hasta más de 80 años según registros de los propietarios, independientemente del tipo de manejo. Debido a la variación de los patógenos que se han encontrado en diferentes estudios y lugares del mundo, el objetivo de este trabajo fue determinar el agente(es) causal(es) asociados a la muerte regresiva de la palma canariense (*P. canariensis*) en la zona conurbada de Santiago de Querétaro, Querétaro.

El área de estudio fue la ciudad de Querétaro y áreas circunvecinas, que comprende los municipios de Querétaro, El Marqués y Corregidora. Se dividió en cuatro cuadrantes, tomando como punto medio la zona centro y como referencia el norte magnético. Durante la investigación se realizaron recorridos (septiembre de 2014 a agosto de 2015) en las avenidas, bulevares principales, parques públicos, así como sitios de propiedad privada cuando se observaron palmas canarienses. Los recorridos iniciaron en el cuadrante I y terminaron en el IV, de esta forma se tomaron en cuenta palmas sanas, muertas y con síntomas iniciales clasificándose en: a) palmas con hojas basales muertas, b) hoja

avenues, main boulevards, public parks, as well as privately owned sites when Canarian palms were observed. The tours began in quadrant I and ended in IV, thus considering healthy, dead palms and those with initial symptoms, classifying them as: a) palms with dead basal leaves, b) dead flag leaf (apical meristem) and c) the combination of both symptoms.

To carry out the sampling, diseased palms were felled in the four quadrants, so that at least two palms per quadrant were sectioned. The selected palms were felled with a Still MS660® chainsaw and with Felco® scissors, the leaves that presented the symptoms of color change in the rachis were cut (Figure 1 A and D). To obtain the apical meristem of the felled palms, they were sectioned to get the top (Figure 1 B and C). All samples were preserved in paper bags and in turn inside plastic bags in a cooler with frozen gel for microbiological analysis.

The samples were analyzed in the Microbiology laboratory of Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Tissues from the leaf rachis and meristem (<0.8 cm) that presented the transition from healthy to diseased tissue were cut, which were disinfected with 2% sodium hypochlorite for 2 min and washed in sterile distilled water (three washes), subsequently, they were allowed to dry on sterile paper towels. Fragments were placed in humid chambers in Petri dishes with sterile filter paper and moistened with sterile distilled water. Of the total palms sampled, six humid chambers were prepared with five pieces of rachis per plant and three chambers with five pieces of apical meristem per plant. As control, two Petri dishes were prepared in a humid chamber with asymptomatic tissue, one of rachis tissue and the other of meristem. The humid chambers were incubated at room temperature for three days.

Once the presence of fungal growth was detected, slides were prepared using a Leica® Zoom 2000 dissection microscope and morphological

bandera muerta (meristemo apical) y c) la combinación de ambos síntomas.

Para realizar el muestreo se derribaron palmas enfermas en los cuatro cuadrantes, de manera que al menos dos palmas por cuadrante fueron seccionadas. Las palmas seleccionadas, se derribaron con motosierra Still MS660® y con tijeras Felco® se cortaron las hojas que presentaron los síntomas de cambio de color en el raquis (Figura 1 A y D). Para obtener el meristemo apical de las palmas derribadas, se seccionaron para conseguir el cogollo (Figura 1 B y C). Todas las muestras se preservaron en bolsas de papel y a su vez dentro de bolsas de plástico en hielera con gel congelado para el análisis microbiológico.

Las muestras se analizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se cortaron tejidos de raquis de la hoja y meristemo (<0.8 cm) que presentaron la transición de tejido sano-enfermo, los cuales, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y lavados en agua destilada estéril (tres lavados), posteriormente, se dejaron secar en sanitas estériles. Los fragmentos se colocaron en cámaras húmedas en cajas Petri preparadas con papel filtro estéril y humedecido con agua destilada estéril. Del total de palmas muestreadas, se prepararon seis cámaras húmedas con cinco trozos de raquis por planta y tres cámaras con cinco piezas de meristemo apical por planta. Como testigo se prepararon dos cajas Petri en cámara húmeda con tejido asintomático, una de tejido de raquis y otra de meristemo. Las cámaras húmedas se incubaron a temperatura ambiente durante tres días.

Una vez detectada la presencia de crecimiento de hongos, se prepararon laminillas utilizando microscopio de disección Leica® Zoom 2000 y se realizó la determinación morfológica con las claves de Barnett y Hunter (2003) y Booth (1971). Las colonias de hongos se transfirieron por punta de hifa



Figure 1. Canary palm (*Phoenix canariensis*) associated with dieback collected in the metropolitan area of the city of Querétaro, Querétaro. A) Rachis with brown color change along the central part. B) Section of the apical meristem with soft rot. C) The longitudinal section of the apical meristem and dead flag leaf is observed. D) Cross section of the same rachis, showing a color with a pink tendency in the upper section.

Figura 1. Palma canariense (*Phoenix canariensis*) asociada a la muerte regresiva colectada en la zona conurbada de la ciudad de Querétaro, Querétaro. A) Raquis con cambio de color café a lo largo de la parte central. B) Sección del meristemo apical con pudrición blanda. C) Se observa el corte longitudinal del meristemo apical y hoja bandera muerta. D) Corte transversal del mismo raquis, se aprecia un color con tendencia rosa en la sección superior.

determination was performed using the Barnett and Hunter (2003) and Booth (1971) keys. The fungal colonies were transferred by hyphal tip to Petri dishes with PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium (Bioxon®), while the bacterial colonies obtained from the apical meristems with soft rot were cultured in Petri dishes with nutrient agar medium (Bioxon®).

a cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) (Bioxon®), mientras que las colonias bacterianas obtenidas de los meristemos apicales con pudrición blanda, se sembraron en cajas Petri con medio agar nutritivo (Bioxon®).

Para la identificación molecular de los hongos, se realizó la extracción del ADN usando el método por Mirhendi *et al.* (2010). Se utilizaron

For the fungi molecular identification, DNA extraction was performed using the method by Mirhendi *et al.* (2010). The following primers were used: ITS1-TCCGTAGGTGAACCTGCGG and ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC; which amplifies a size of 500 bp of the ITS region of rDNA. PCR conditions were initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 25 cycles at 58 °C for 30 seconds (alignment), 72 °C for 2 min (extension), 95 °C for 30 s (denaturation). and a final extension at 72 °C for 10 minutes (White *et al.*, 1990). The amplified PCR products were sent for sequencing to the Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), of Centro de Investigacion y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Irapuato, Guanajuato, Mexico for identification. The fungal sequences were compared with the database deposited in GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). With the generated sequences in this work and those from the gene bank (NCBI), a matrix was built using the McClade 4.0 program (Maddison and Maddison, 2000). Dendrograms were constructed using the principles of parsimony, maximum likelihood, and Bayesian inference. For the construction of the parsimony tree, the PAUP 4.0b10 program (Swofford, 2002) was used, with a heuristic search of 1000 replicates, as well as bootstraps. The maximum likelihood tree was built with the RaxML program (Stamatakis, 2006), using the GTRGAMMA model, with 1000 replicates and a bootstrap of 1000 replicates. Finally, the Bayes tree was built using the MrBayes 3.1.2 program (Ronquist and Helsenbeck, 2003), with the GTR invgamma model, with four simultaneous runs and a sampling frequency of 100.

On the other hand, Koch's postulates were carried out with one of the fungi strains obtained. For this, two-year-old *P. canariensis* seedlings were used, which were disinfected by immersion of the

los siguientes cebadores: ITS1-TCCGTAGGTGA-ACCTGCGG y ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC; el cual amplifica un tamaño de 500 pb de la región ITS de ADNr. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguidos de 25 ciclos a 58 °C por 30 segundos (alineamiento), 72 °C por 2 min (extensión), 95 °C por 30 s (desnaturalización) y una extensión final a 72 °C por 10 minutos (White *et al.*, 1990). Los productos amplificados de PCR se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Irapuato, Guanajuato, México para su identificación. Las secuencias de los hongos se compararon con la base de datos depositadas en GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con las secuencias generadas en este trabajo y las del banco de genes (NCBI) se construyó una matriz en el programa McClade 4.0 (Maddison y Maddison, 2000). Se construyeron dendogramas usando los principios de parsimonia, máxima verosimilitud y bayesiano. Para la construcción del árbol de parsimonia se usó el programa de PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), con una búsqueda heurística de 1000 réplicas, así como de un bootstrap. El árbol de máxima verosimilitud se construyó con el programa RaxML (Stamatakis, 2006), usando el modelo GTRGAMMA, con 1000 réplicas y un bootstrap de 1000 réplicas. Finalmente, el árbol de Bayes se construyó usando el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Helsenbeck, 2003), con el modelo GTR invgamma, con cuatro corridas simultáneas y una frecuencia de muestreo de 100.

Por otro lado, se realizó los postulados de Koch con una de las cepas de los hongos obtenidos. Para ello, se utilizaron plántulas de *P. canariensis* de dos años de edad, mismas que fueron desinfectadas por inmersión a raíz desnuda con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 2 min; posteriormente, se

bare root in a 1% sodium hypochlorite solution for 2 min; subsequently, they were washed by immersion in sterile water and transplanted in sterile substrate. Irrigations were carried out with sterile water. 30 seedlings were inoculated by spraying with a solution of 1×10^6 conidia in the roots, additionally a puncture was made in the rachis of the leaves to facilitate fungi infection, that is, the test specimens were double inoculated. Five seedlings were used as a control and were kept at room temperature in the laboratory. The seedlings were checked every third day until visible and characteristic symptoms of the disease were observed. Subsequently, samples were taken from the plants with symptoms to re-isolate the fungus.

For bacteria identification, basic identification tests were done using the manual of Schaad *et al.* (2001). Isolations were made in selective media such as King B medium and oxidation and fermentation tests (Huge and Leifson). Subsequently, Biolog® plates were used, with sugar acidification tests (salicin, melibiose, lactose, raffinose, sorbitol, maltose, and inositol). Additionally, complementary tests were performed: gas production from glucose, gelatin liquefaction, indole production, Simmons citrate agar, tolerance to 5% NaCl, growth at temperatures of 30 and 37 °C, and triple sugar iron agar. indicated by Schaad *et al.* (2001).

In addition, a meristem sample (dead flag leaf) and petiole were sent to the Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) for analysis in the mycology, bacteriology, and virology laboratories. Finally, to determinant the correspondence of the three types of symptoms that the plants presented during the sampling, a Chi square test (X^2) was carried out to determine which symptom was the most frequent in the urban area.

During the rounds, 262 palms were sampled, of which 95 were asymptomatic (36.3%), 122 dead (46.6%) and 45 were observed to be sick

lavaron por inmersión en agua estéril y trasplantaron en sustrato estéril. Se realizaron los riegos solo con agua estéril. Se inocularon 30 plántulas por aspersión con una solución de 1×10^6 conidios en las raíces, adicionalmente se les hizo una punción en el raquis de las hojas para facilitar la infección por el hongo, es decir a los ejemplares de prueba se les realizó doble inoculación. Como testigo se usaron cinco plántulas y se mantuvieron a temperatura ambiente en laboratorio. Las plántulas se revisaron cada tercer día hasta observar síntomas visibles y característicos de la enfermedad, posteriormente, se tomaron muestras de las plantas con síntomas para volver a aislar el hongo.

Para el caso de la identificación de bacterias se usaron las pruebas básicas de identificación con el manual de Schaad *et al.* (2001). Se hicieron aislamientos en medios selectivos como en B de King y prueba de oxidación y fermentación (Huge y Leifson). Posteriormente, se utilizaron placas Biolog, con las pruebas de acidificación de azúcares (salicina, melibiosa, lactosa, raffinosa, sorbitol, maltosa e inositol). Adicionalmente, se hicieron pruebas complementarias: producción de gas a partir de glucosa, licuefacción de la gelatina, producción de indol, agar citrato de Simmons, tolerancia a NaCl al 5%, crecimiento a temperaturas de 30 y 37 °C y agar hierro triple azúcar indicadas por Schaad *et al.* (2001).

Además, una muestra de meristemo (hoja bandera muerta) y de peciolo se envió al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para su análisis en los laboratorios de micología, bacteriología y virología. Finalmente, para determinar la correspondencia de los tres tipos de síntomas que presentaron las plantas durante el muestreo, se realizó una prueba de Chi cuadrada (X^2) para determinar cuál síntoma es el que se presentó con mayor frecuencia en la zona urbana.

En los recorridos se muestrearon 262 palmas, de las cuales 95 fueron asintomáticas (36.3%),

(17.2%), only 42 presented combined symptoms of dead basal leaves and dead flag leaf, two of them presented only the dead basal leaves, and one presented the dead flag leaf. The Chi square test indicated that the combination of basal leaf death and flag leaf death are the symptoms of diseased plants with 95% confidence ($0.03 \leq 0.04$). Of the 12 palms analyzed, 72 humid chambers were prepared for the search for fungi in the rachis and 36 for the search for bacteria in the apical meristem.

From the humid chambers, only 24 fungal growths were observed, and the isolation done by hyphal tip, the genus *Fusarium* was consistently obtained, corresponding to two isolates for each felled palm (12 isolates). Of the 12 isolates, only four were molecularly identified, which corresponded to *Fusarium* sp. in the *F. incarnatum* complex (F1) with a beige mycelial coloration, of conidia with pedicelled cells; while three of them corresponded to *Fusarium* sp. in the *F. verticillioides* complex violet mycelial color and microconidia formed in chains (F2, F3 and F4) (Figure 2). Likewise, an isolate was determined morphologically, identified also as *F. solani* with a pale purple mycelial color and abundant oval microconidia. Colony and morphological characteristics were correspondent as proposed by Booth (1971). Part of the plant material from which *F. solani* was obtained was isolated and confirmed by the Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), who isolated and identified the same species of fungus.

This phytosanitary problem is distributed throughout the urban area of the city of Queretaro, since diseased and dead plants were found in the four quadrants. It is important to highlight that when the symptoms appear on the flag leaf, the damage is irreversible, that is, the death of the plant is imminent, as mentioned by Tomlinson (2012) who points out that within the crown itself, it is made up of tissues meristematic and differentiating, the

122 muertas (46.6%) y 45 se observaron enfermas (17.2%), solo 42 presentaron síntomas combinados de hojas basales muertas y hoja bandera muerta, dos presentaron solo las hojas basales muertas y una presentó la hoja bandera muerta. La prueba de Chi cuadrada indicó que la combinación de la muerte de hojas basales y de la hoja bandera son los síntomas de las plantas enfermas con un 95% de confianza ($0.03 \leq 0.04$). De las 12 palmas analizadas, se prepararon 72 cámaras húmedas para la búsqueda de hongos en el raquis y 36 para la búsqueda de bacterias en el meristemo apical. De las cámaras húmedas, solo 24 se observó crecimiento de hongos, y a partir del aislamiento por punta de hifa, se obtuvo consistentemente al género *Fusarium* correspondiendo a dos aislamientos por cada palma derribada (12 aislamientos). De los 12 aislamientos, solo cuatro se identificaron molecularmente, que correspondió a *Fusarium* sp. en el complejo *F. incarnatum* (F1) con una coloración beige micelial, de conidios con célula pedicelada; mientras que tres de ellas correspondieron a *Fusarium* sp. en el complejo *F. verticillioides* de color violeta micelial y de microconidios formados en cadenas (F2, F3 y F4) (Figura 2). Así mismo, un aislamiento se determinó morfológicamente identificándose como *F. solani* con color micelial morado pálido y abundantes microconidios ovalados. Las características morfológicas y de colonias se respaldaron por Booth (1971). Parte del material vegetal del que se obtuvo *F. solani*, fue aislado y confirmado por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), quienes aislaron e identificaron a la misma especie de hongo.

Este problema fitosanitario se encuentra distribuido en toda la mancha urbana de la ciudad de Querétaro ya que en los cuatro cuadrantes se encontraron plantas enfermas y muertas. Es importante resaltar que cuando los síntomas se presentan en la hoja bandera el daño es irreversible, es decir,

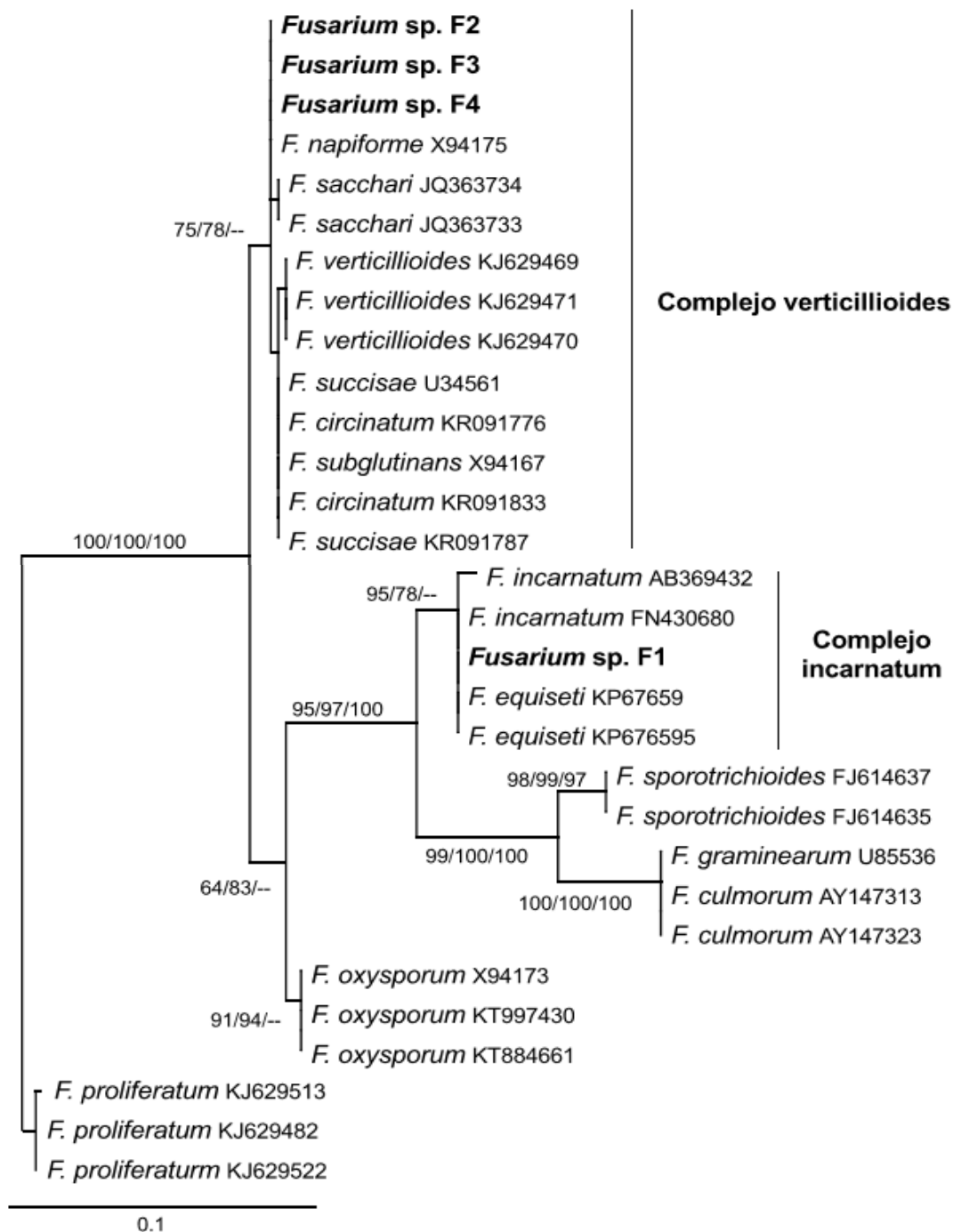


Figure 2. Maximum likelihood tree, with the phylogenetic position of the four *Fusarium* strains (in bold). The values of the branches correspond to the support of parsimony bootstrap/maximum likelihood bootstrap/posterior probabilities.

Figura 2. Árbol de máxima verosimilitud, con la posición filogenética de las cuatro cepas de *Fusarium* (señalado en negritas). Los valores de las ramas corresponden al soporte de bootstrap de parsimonia/bootstrap de máxima verosimilitud/probabilidades posteriores.

latter derives from the former and consists of cells in a state of mitotic turnover and the cells that form the young tissues of the trunk; Thus, according to what was observed in this investigation, since the apical meristem is necrotic, the palm is considered dead.

On the other hand, the pathogenicity test was carried out only with *F. solani* due to the high frequency found in humid chambers. At 30 days, the inoculated seedlings showed the color change in the rachis of the leaves where the apical parts began to wither and later advanced towards the base of this; additionally, wilting was observed in the leaflets. All plants died 60 days after inoculation, while control plants remained healthy. The fungus was isolated again from the inoculated plants, confirming its presence of *F. solani* (Figure 3 A).

Although Elliott (2015) points to *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* as the causal agent of wilt in *P. canariensis*, this study broadens the range of pathogens such as *F. solani* (pathogenicity test) and the fungi *Fusarium* spp. (without pathogenicity test)

la muerte de la planta es inminente, así como menciona Tomlinson (2012) quien señala que dentro de la corona en sí, se compone de tejidos meristemáticos y diferenciadores, este último deriva del primero y consta de células en estado de recambio mitótico y las células que forman los tejidos jóvenes del tronco; así pues conforme a lo observado en esta investigación, al estar necrosado el meristemo apical, la palma se considera muerta.

Por otra parte, la prueba de patogenicidad se realizó únicamente con *F. solani* debido la alta frecuencia encontrada en las cámaras húmedas. A los 30 días, las plántulas inoculadas mostraron el cambio de color en el raquis de las hojas donde las partes apicales se empezaron a marchitar y posteriormente avanzó hacia la base del mismo; adicionalmente, se observó marchitez en los foliolos. Todas las plantas murieron a los 60 días después de la inoculación, mientras que las plantas testigo permanecieron sanas. El hongo se volvió a reaislar de las plantas inoculadas confirmandose la presencia de *F. solani* (Figura 3 A).



Figure 3. Symptoms of Canary palm (*P. canariensis*). A) The color change in the rachis of the inoculated leaf is observed, which indicates an infection process. B) Specimen of *P. canariensis* affected in basal leaves and flag leaf. C) Same specimen one month later. D) Young palm with dead flag leaf.

Figura 3. Síntomas en palma canariense (*P. canariensis*). A) Se observa el cambio de color en el raquis de la hoja inoculada lo cual indica un proceso de infección. B) Ejemplar de *P. canariensis* afectado en hojas basales y hoja bandera. C) Mismo ejemplar un mes después. D) Palma joven con la hoja bandera muerta.

associated with the dieback of *P. canariensis* in the urban area of Queretaro. In this regard, Mansoori and Kord (2006) found that *F. solani* attacks the date palm (*Phoenix dactylifera*) in Iran, causing the “yellow death”; with the symptoms of severe generalized yellowing and dry leaves adhered to the plant; However, these symptoms do not agree with what was observed in this investigation, since the observed symptoms coincide with what was described by Broschat (2013) in the United States and Elliott (2015) in Florida, where they are reported to *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* attacking this palm species.

On the other hand, during the dissection of the apical meristem of the analyzed palms, a fetid aroma was detected, as well as the arrival of flies from the families Muscidae and Calliphoridae, characteristic of soft rots of bacterial origin, as indicated by the studies by Pérez-Aragon *et al.* (2013), who determined *Erwinia* sp., which was identified in this research. This bacterium causes soft rot in the apical meristem, the palms in which it has access to the flag leaf, detach easily since its attachment to the apex of the stem becomes necrotic. In the case of planting the apical meristem to determine the presence of bacteria, 19 (19/36) colonies were obtained from the humid chambers, which corresponded to 11 of the 12 palms analyzed. Rivas and Herrera (2015) also identified *Erwinia* spp., in the oil palm (*Elaeis guineensis*) suggesting that the bacterium may contribute to the final phases of the rotting process of the plant apical meristem.

However, the sample of meristem sent to the CNRF for the detection of bacteria was positive by the PCR protocol for the detection of the phytoplasm of lethal yellowish of the coconut (ALC), which corresponds to what is reported by Harrison *et al.* (2002) where they detected high mortality of *P. canariensis* with similar symptoms to those of ALC (Texas Phoenix decline) in Texas. This phytosanitary problem is also studied by Gurr *et al.*

Aunque Elliott (2015) señala a *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* como el agente causal de la marchitez en *P. canariensis*, en este estudio se amplía el rango de patógenos como *F. solani* (prueba de patogenicidad) y los hongos *Fusarium* spp. (sin prueba de patogenicidad) asociados a la muerte regresiva de *P. canariensis* en la zona urbana de Querétaro. Al respecto Mansoori y Kord (2006) encontraron que *F. solani*, ataca a la palma datilera (*Phoenix dactylifera*) en Irán ocasionando la “muerte amarilla”; con los síntomas de un severo amarillamiento generalizado y hojas secas adheridas a la planta; no obstante, estos síntomas no concuerdan a lo observado en esta investigación, ya que los síntomas observados coinciden con lo descrito por Broschat (2013) en Estados Unidos y Elliott (2015) en Florida, donde se reporta a *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* atacando a esta especie de palma.

Por otro lado, durante la disección del meristemo apical de las palmas analizadas, se detectó un aroma fétido, así como el arribo de moscas de las familias Muscidae y Calliphoridae característico en las pudriciones blandas de origen bacteriano, como lo indican los estudios por Pérez-Aragón *et al.* (2013), quienes determinaron a *Erwinia* sp., el cual, fue identificada en esta investigación. Esta bacteria ocasiona pudrición blanda en el meristemo apical, las palmas a las que se tiene acceso a la hoja bandera, se desprenden con facilidad ya que su unión al ápice del tallo se necrosa. En el caso de la siembra del meristemo apical para determinar la presencia de bacterias, se obtuvo 19 (19/36) colonias de las cámaras húmedas, las cuales correspondieron a 11 de las 12 palmas analizadas. De acuerdo con Rivas y Herrera (2015) identificaron también a *Erwinia* spp., en la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) sugiriendo que la bacteria puede contribuir en las fases finales del proceso de pudrición del cogollo de la planta.

Por otro lado, la muestra de meristemo enviada al CNRF para la detección de bacterias resultó

(2016) in Puerto Rico and Florida of the American Union, as well as in Mexico, and corresponds to group IV-D of the 16Sr gene; although in the case of Mexico the detection analyzes were mainly in palms other than *P. canariensis*, as indicated by Aviña-Padilla *et al.* (2011) who analyzed positive samples for the phytoplasma in *P. dactylifera* and *Sabal mexicana*. Mora-Aguilera *et al.* (2016) indicate that the typical symptoms of ALC consist of necrosis of the developing inflorescence, drop of small fruits, yellowing of the fronds starting from the lower ones, total defoliation, and death. Figure 3 (B and C) shows a specimen of the Canarian palm at least 30 years old, with the basal leaves and the flag leaf dead. Whereas in Figure 3 (D), a young palm (>8 years old) showing death of the flag leaf with asymptomatic basal leaves is observed.

The results of this study indicate that the dieback of *P. canariensis* in the metropolitan area of the city of Queretaro is associated with a microbial complex: phytoplasma of lethal yellowing of the coconut palm (confirmed by CNRF), *Erwinia* sp. as well as fungi, in a complex of *Fusarium* spp. and *F. solani*, the latter confirmed by Koch's postulates. However, it is important to highlight that more studies are required to determine the etiology of this syndrome; as well as carrying out tests with all the isolates obtained in this study to evaluate the pathogenicity in the palms; likewise, the evaluation in a greater number of plants to corroborate the presence of the phytoplasma, since plants of all ages have died in the entire metropolitan area of the city of Queretaro.

ACKNOWLEDGMENTS

The collaboration of Eng. Eliseo Romero-Valencia is appreciated for coordinating with the nursery of the Municipality of Queretaro for the review of some of the felled palms. To Autonomous University of Queretaro for supporting the FNB-2014-07 project.

positiva por el protocolo de PCR para la detección del fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero (ALC), lo cual corresponde con lo reportado por Harrison *et al.* (2002) donde detectaron alta mortalidad de *P. canariensis* con síntomas similares a los del ALC (Texas Phoenix decline) en Texas. Este problema fitosanitario es estudiado también por Gurr *et al.* (2016) en Puerto Rico y Florida de la Unión Americana, así como en México, y corresponde al grupo IV-D del gen 16Sr; aunque en el caso de México los análisis de detección fueron principalmente en palmas diferentes a *P. canariensis*, como lo indica Aviña-Padilla y colaboradores (2011) que analizaron muestras positivas al fitoplasma en *P. dactylifera* y *Sabal mexicana*. Mora-Aguilera *et al.* (2016) indican que los síntomas típicos de ALC consisten en necrosis de la inflorescencia en desarrollo, caída de frutos pequeños, amarillamiento de las frondas iniciando por las inferiores, defoliación total y muerte. En la Figura 3 (B y C) se aprecia un ejemplar de la palma canaria de al menos 30 años de edad, con las hojas basales y la hoja bandera muerta. Por otro lado, en la Figura 3 (D), se observa una palma joven (>ocho años) que presenta muerte de la hoja bandera con hojas basales asintomáticas.

Los resultados de este estudio indican que la muerte regresiva de *P. canariensis* en la zona conurbada de la ciudad de Querétaro está asociada por un complejo microbiano: fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero (confirmado por CNRF), *Erwinia* sp. así como hongos, en un complejo de especies *Fusarium* spp. y *F. solani*, este último confirmado por postulados de Koch. No obstante, es importante resaltar que se requieren más estudios para conocer la etiología de este síndrome; al igual de realizar pruebas con todos los aislamientos obtenidos en este estudio para evaluar la patogenicidad en las palmas; así mismo, la evaluación en un mayor número de plantas para corroborar la presencia

CITED LITERATURE

- Arai K and Yamamoto A. 1977. New *Fusarium* disease of canary island date palm in Japan. Bulletin of the Faculty of Agriculture. Kagoshima University 27:31–37. <http://www.ir.kagoshima-u.ac.jp>.
- Aviña Padilla K, Rodríguez Páez LA, Nava Castrejón AI, Ochoa Sánchez JC, R Rivera Bustamante and Martínez Soriano JP. 2011. Epidemic of lethal yellowing disease affecting *Phoenix dactylifera* and *Sabal mexicana* in Central Mexico. Bulletin of Insectology 64: S221-S222. <http://www.academia.edu/1060354/>.
- CABI (Center for Agriculture and Bioscience International). 2016. *Phoenix canariensis* (Canary Island date palm). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/40697> (Consulta, enero 2019).
- Barnett HL and Hunter BB. 2003. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. Prentice Hall. St. Paul, Minnesota. ISBN 0-089054-192-2. 217 p.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Surrey, England: Commonwealth mycological institute. First edition. ISBN 85198-046-5. 237 p.
- Broschat TK. 2013. *Phoenix canariensis*: Canary Island Date Palm. Environmental Horticulture Department, University of Florida. <http://www.Fact Sheet ENH-598. edis.ifas.ufl.edu>.
- Elliott ML. 2015. *Fusarium* Wilt of Canary Island Date Palm. U. S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida. P. 215. <http://www.edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP13900.pdf>.
- Feather TV, Ohr HD and Munnecke DE. 1979. Wilt and dieback of Canary Island palm in California. California Agriculture. <http://www.calag.ucanr.edu/Archive/?article=ca.v033n07p19>.
- Franqueville HD. 2001. La pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina. Revisión preliminar de hechos y logros alcanzados. CIRAD. 35 p. <http://www.bio-nica.info/Biblioteca/Franqueville 2001>.
- Garofalo J y McMillan RT Jr. 2003. Marchitez por *Fusarium* en palmas del género *Phoenix* del sur de Florida. University of Florida. Extension Service. Hoja informativa No. 91. <http://www.fshs.org>.
- Garofalo JF and McMillan RT Jr. 1999. *Phytophthora* bud-rot of palms in South Florida. Proceedings of Florida State Horticulture Society 112: P. 110. <http://www.fshs.org/proceedings-o/1999-vol-112/110-112>.
- Gurr G, Johnson MAC, Ash GJ, Wilson BAL, Ero MM, Pilotti CA, Dewhurst CF and You MS. 2016. Coconut lethal yellowing diseases: A phytoplasma threat to palms of global economic and social significance. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1521. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01521>.
- Harrison NA, Womack M and Carpio ML. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease*. 86: 676–681. <http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2002/June>.
- del fitoplasma, ya que plantas de todas las edades han muerto en toda la zona conurbada de la ciudad de Querétaro.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del Ing. Eliseo Romero-Valencia por la coordinación con el vivero del Municipio de Querétaro para la revisión de algunas de las palmas derribadas. A la Universidad Autónoma de Querétaro por apoyo al proyecto FNB-2014-07.

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

- Maddison DR and Maddison WP. 2000. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2606395>.
- Mansoori B and Kord MH. 2006. Yellow death: A Disease of Date Palm in Iran Caused by *Fusarium solani*. *Journal of Phytopathology* 154: 125-127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01067.x>.
- Mirhendi H, Ghiasian A, Vismer HF, Asgary MR, Jalalizand N, Arendrup MC and Makimura K. 2010. Preliminary Identification and Typing of Pathogenic and Toxigenic *Fusarium* Species Using Restriction Digestion of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region. *Iranian Journal of Public Health* 39: 35-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salin C, Flores-Olivas A, González-Gómez R y Robles-García P. 2014. Epidemiological Surveillance and Current Status of Coconut Lethal Yellowing, Potato Purple Top and Citrus Huanglongbing (HLB) in Mexico. *Journal Mexican Phytopathology* 32(2): 20-131.
- Pane A, Allatra C, Sammarco G and Cacciola SO. 2007. First Report of Bud Rot of Canary Island Date Palm Caused by *Phytophthora palmivora* in Italy. *American Phytopathological Society* 91(8): 1,059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1059A>.
- Pérez Aragón B, García Salazar JE, Landeros Jaime F, Caltzontzin Fernández K, Romero Valencia E y Vergara-Pineda S. 2013. Muerte regresiva en *Phoenix canariensis* y sus agentes causales en el Municipio de Querétaro. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Suplemento 31. P. S79. <http://www.rmfm.smf.org.mx/suplemento/docs/resumen/ResumenesOrales>.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.



- Rivas FF y Herrera IL. 2015. Organismos asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) en san Lorenzo, Ecuador. Revista Protección Vegetal 30(3): 193-203. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n3/rpv05315.pdf>
- Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. 373 p.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22: 2688–2690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- Swofford DL. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. <http://www.researchgate.net/publication/271205405>.
- Tomlinson PB, Huggett BA. 2012. Cell longevity and sustained primary growth in palm stems. American Journal of Botany 99(12): 1891–1902. doi.org/10.3732/ajb.1200089.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Ed). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York, 315-322 p. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990>.

# *In vitro* inhibition of bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2

## Inhibición *in vitro* de bacterias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2

José Guadalupe Florencio-Anastasio<sup>1,2</sup>, \*Alejandro Alarcón<sup>1</sup>, Clemente de Jesús García-Ávila<sup>2</sup>, Ronald Ferrera-Cerrato<sup>1</sup>, Andrés Quezada-Salinas<sup>2</sup>, Juan José Almaraz-Suárez<sup>1</sup>, Mario Espinosa-Mendoza<sup>2</sup>, Daniela Alejandra Bocanegra-Flores<sup>2</sup>, Lervin Hernández-Ramos<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, 56230 Texcoco, Estado de México, México. <sup>2</sup>Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, 55740 Tecámac, Estado de México, México.

\*Corresponding author: aalarconcp@gmail.com

Received: July 04, 2022.

Accepted: December 27, 2022.

Florencio-Anastasio JG, Alarcón A, García-Ávila CJ, Ferrera-Cerrato R, Quezada-Salinas A, Almaraz-Suárez JJ, Espinosa-Mendoza M, Bocanegra-Flores DA and Hernández-Ramos L. 2023. *In vitro* inhibition of bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 126-142.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-2>

First DOI publication: December 29, 2022.

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2022.

**Abstract.** There are three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) that affect bananas and plantains, though the Cavendish group banana cultivars are resistant to Foc race 1 (FocR1) and Foc race 2 (FocR2). However, there are no effective control methods for the Tropical Race 4 (R4T). The foregoing makes it necessary to generate biological control strategies for FocR2 fungal

**Resumen.** Existen tres razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) que afectan a bananos y plátanos, los cultivares de banano grupo Cavendish son resistentes a Foc raza 1 (FocR1) y Foc raza 2 (FocR2). Sin embargo, no existen métodos de control efectivos para la Raza 4 Tropical (R4T). Lo anterior, hace necesario generar estrategias de control biológico utilizando a FocR2 como modelo fúngico que está presente en México, y que coadyuven ante la posible introducción de FocR4T al país. Se evaluó la inhibición *in vitro* de las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* (BASU), *B. velezensis* (BAVE), *B. sonorensis* (BASO) contra tres aislamientos de FocR2 (MIC17188, MIC17191 y MIC17192) obtenidos de muestras vegetales colectadas en tres sitios de producción de plátano de Puebla, Michoacán y Oaxaca. A los 14 días, la cepa BASU tuvo en promedio, mayor inhibición (55.1%) con respecto a BAVE y BASO (45.8 y 21.7%, respectivamente) contra las tres cepas fúngicas antes mencionadas.

model that is present in Mexico, forecasting the potential introduction of FocR4T into our country. *In vitro* inhibition was evaluated of bacterial strains *Bacillus subtilis* (BASU), *B. velezensis* (BAVE), and *B. sonorensis* (BASO) against three isolates of FocR2 (MIC17188, MIC17191 and MIC17192), obtained from plant samples collected in three banana production sites in the states of Puebla, Michoacán and Oaxaca. At 14 days, the strain BASU had in average high inhibition (55.1% in comparison to BAVE and BASO strains (45.8 and 21.7%, respectively) against the three fungal strains mentioned before. In addition, the *in vitro* inhibition of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. (AC35) was also evaluated by considering three pre-inoculation timings; the strain BSP1.1 showed high inhibition (80.1%) when pre-inoculated individually seven days before the fungus and at seven days of confrontation.

**Key words:** *Fusarium* wilt, *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus sonorensis*.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), causal agent of *Fusarium* wilt or musaceae *Fusarium* wilt, was reported for the first time in Australia, in 1874, and later in 1890, it was reported in Panama and Costa Rica (America); therefore, it is assumed that this pathogen spread from these two countries to the rest of this continent (Ashby, 1913; Fish, 1970). There are three races of this pathogen that affect plantains and bananas: i) Race 1 (FocR1), affects *Musa textilis* (abacá), bananas from the Gros Michel clones (AAA), Maqueño (AAB), Silk (AAB), Pome (AAB), Pisang Awak (ABB) and IC2 (AAAA); ii) Race 2 (FocR2), affects bananas from Bluggoe clones (ABB) and other AAAA genome hybrids; and iii) Tropical Race 4 (FocR4T) is an aggressive

También se evaluó la inhibición *in vitro* de las bacterias *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. (AC35) en tres tiempos de pre-inoculación bacteriana. La cepa BSP1.1 presentó mayor inhibición (80.1%) cuando se pre-inoculó de manera individual, siete días antes del hongo y durante siete días de confrontación.

**Palabras clave:** Marchitez por *Fusarium*, *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus sonorensis*.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), agente causal de la marchitez por *Fusarium* o Fusariosis de las musáceas, se reportó por primera vez en Australia, en 1874, y posteriormente, en 1890 se reportó en Panamá y Costa Rica (América); por lo que, se asume que este patógeno se dispersó desde estos dos países al resto de este continente (Ashby, 1913; Fish, 1970). Existen tres razas de este patógeno que afectan plátanos y bananos: i) Raza 1 (FocR1), afecta a *Musa textilis* (abacá), bananos de los clones Gros Michel (AAA), Maqueño (AAB), Silk (AAB), Pome (AAB), Pisang Awak (ABB) e IC2 (AAAA); ii) Raza 2 (FocR2), afecta bananos de clones Bluggoe (ABB) y otros híbridos del genoma AAAA; y iii) la Raza 4 Tropical (FocR4T), es un patógeno agresivo en los cultivares Cavendish (AAA), como Dwarf Cavendish, Grand Nain y Williams, así como en los demás cultivares susceptibles a FocR1 y FocR2 (Su *et al.*, 1986; Ploetz, 2005). En México, esta enfermedad se reportó por primera vez en 1932 (Ploetz, 2018); así mismo, Florencio-Anastasio *et al.* (2022) determinaron mediante un análisis filogenético que cuatro aislamientos de Foc obtenidos de muestras de los estados de Puebla y Michoacán se agruparon dentro del Clado VI de la clasificación propuesta por Fourie *et al.* (2009) y Karangwa *et al.* (2018). FocR1 ha pro-

pathogen in Cavendish cultivars (AAA), such as Dwarf Cavendish, Grand Nain and Williams, as well as in other cultivars susceptible to FocR1 and FocR2 (Su *et al.*, 1986; Ploetz, 2005). In Mexico this disease was reported for the first time in 1932 (Ploetz, 2018); Likewise, Florencio-Anastasio *et al.* (2022) determined through a phylogenetic analysis that four Foc isolates obtained from samples from the states of Puebla and Michoacan were grouped within Clade VI of the classification proposed by Fourie *et al.* (2009) and Karangwa *et al.* (2018). FocR1 has caused severe epidemics that impacted the banana industry in America, whose production was based on the Gros Michel variety, which caused the disappearance of most of the commercial plantations of this variety between 1950 and 1960, causing economic losses of up to \$2.3 billion dollars (Dita *et al.*, 2013). In the Ulua Valley (Honduras) 30,000 ha were lost from 1940 to 1960; while in Suriname and Quepos (Costa Rica) 4,000 and 6,000 ha were damaged in a period of eight and 12 years, respectively (Ploetz, 2000).

In Mexico, during the 1960s and early 1970s, close to 40,000 ha cultivated with the Gros Michel variety were destroyed; Only in 1994 there were around 4,000 ha of Manzano plantains, which were reduced to 1,260 ha, in 2004 (Orozco-Santos, 2013) and for the 2020 cycle, 1,690 ha had been established (SIAP, 2022). To counteract the economic losses caused by FocR1, the global solution consisted of replacing those plantations established with Gros Michel by cultivars of the Cavendish subgroup, which represent more than 99 % of export bananas (Dita *et al.*, 2018). On the other hand, FocR4T was first reported in Taiwan in 1989 (Ploetz, 2018), by 2022 its distribution includes Australia, Burma, China, Colombia, the Philippines, India, Indonesia, Mayotte Islands (France), Israel, Jordan, Laos, Lebanon, Malaysia, Mozambique, Oman, Pakistan, Peru, United

vocado severas epidemias que impactaron en la industria bananera en América, cuya producción fue basada en la variedad Gros Michel, lo que provocó la desaparición de la mayoría de las plantaciones comerciales de esta variedad en el período de entre 1950 a 1960, provocando pérdidas económicas de hasta \$2.3 mil millones de dólares (Dita *et al.*, 2013). En el Valle de Ulúa (Honduras) se perdieron 30,000 ha en el período de 1940 a 1960; mientras que en Surinam y Quepos (Costa Rica) se dañaron de 4,000 y 6,000 ha en un período de ocho y 12 años, respectivamente (Ploetz, 2000).

En México, durante la década de 1960 y principios de 1970, cerca de 40,000 ha cultivadas con la variedad Gros Michel fueron arrasadas; tan solo en 1994 había alrededor de 4,000 ha de plátano Manzano, las cuales se redujeron a 1,260 ha, en 2004 (Orozco-Santos, 2013) y para el ciclo 2020 se tenían establecidas 1,690 ha (SIAP, 2022). Para contrarrestar las pérdidas económicas provocadas por FocR1, la solución a nivel mundial consistió en reemplazar aquellas plantaciones establecidas con Gros Michel por cultivares del subgrupo Cavendish, que representan más del 99 % del banano de exportación (Dita *et al.*, 2018). Por otra parte, se reportó por primera vez a FocR4T en Taiwán en 1989 (Ploetz, 2018), para 2022 su distribución comprende Australia, Birmania, China, Colombia, Filipinas, India, Indonesia, Islas Mayotte (Francia), Israel, Jordania, Laos, Líbano, Malasia, Mozambique, Omán, Pakistán, Perú, Reino Unido, Tailandia, Taiwán, Turquía y Vietnam (Ploetz *et al.*, 2018; Promusa, 2018; DOA, 2019; ICA, 2019; Aguayo *et al.*, 2021; García-Bastidas *et al.*, 2020; Özarslan-dan y Akgül, 2020; SENASA, 2021).

La presencia de este patógeno en dos países de América (Colombia y Perú), incrementa el riesgo de su introducción a México (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022). Aun cuando los bananos del grupo Cavendish son resistentes a las razas 1 y 2 (Su *et al.*,

Kingdom, Thailand, Taiwan, Turkey, and Vietnam (Ploetz *et al.*, 2018; Promusa, 2018; DOA, 2019; ICA, 2019; Aguayo *et al.*, 2021; García-Bastidas *et al.*, 2020; Özarslandan and Akgül, 2020; SENASA, 2021).

The presence of this pathogen in two countries of America (Colombia and Peru) increases the risk of its introduction to Mexico (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022). Although Cavendish group bananas are resistant to races 1 and 2 (Su *et al.*, 1986), there are no resistant banana or plantain cultivars or chemicals effective against FocR4T (Cook, 2005). Likewise, some biological control schemes based on the use of antagonistic bacteria and fungi against Foc breeds have been proposed (Bubici *et al.*, 2019); for example, the bacterium *Burkholderia cenocepacia* 869T2 presented 44.4% inhibition *in vitro*, and reduced the incidence of FocR4T in Cavendish bananas by 86.1% in the field (Ho *et al.*, 2015). *Pseudomonas fluorescens* and *P. fluorescens* WCS417 also reduced (83.4 and 87.4%, respectively) the severity of FocR4T in Cavendish bananas in greenhouse. The use of biofertilizers based on pig manure in combination with *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 reduced the incidence of FocR4T in greenhouse Cavendish bananas by 75% (Shen *et al.*, 2015), while the same bacterium decreased the incidence of FocR4T by 68.5% in the field (Xue *et al.*, 2015). On the other hand, *B. amyloliquefaciens* W19 reduced the incidence of Foc by 42.8 and 44.4% in two Cavendish banana fields (Wang *et al.*, 2016); In addition, *B. subtilis* N11 reduced the incidence of FocR4T by 82.1%, while the combination of *Paenibacillus polymyxa* SQR21 + *Trichoderma harzianum* T37 reduced the incidence of FocR4T by 64.3% in Cavendish banana (Zhang *et al.*, 2011). The bacterium *Paenibacillus* sp. BSP.1.1, *Serratia* sp. AC35, *Pseudomonas tolaasii* P61, *Bacillus pumilus* BFIEST 4C, *B. pumilus* R44, *B. pumilus* A1, and *Serratia liquefaciens* CPA C53 inhibited mycelial growth *in vitro* of five Foc Race

1986), no existen cultivares de banano o plátano resistentes o productos químicos efectivos contra FocR4T (Cook, 2005). Así mismo, se han propuesto algunos esquemas de control biológico basados en el uso de bacterias y hongos antagonistas contra las razas de Foc (Bubici *et al.*, 2019); por ejemplo, la bacteria *Burkholderia cenocepacia* 869T2 presentó 44.4% de inhibición *in vitro*, y redujo en 86.1% la incidencia de FocR4T en banano Cavendish en campo (Ho *et al.*, 2015). También *Pseudomonas fluorescens* y *P. fluorescens* WCS417 redujeron (83.4 y 87.4%, respectivamente) la severidad de FocR4T en banano Cavendish en invernadero. El uso de biofertilizantes basados en abono de cerdo en combinación con *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 redujo 75% la incidencia de FocR4T en banano Cavendish en invernadero (Shen *et al.*, 2015), mientras que la misma bacteria disminuyó 68.5 % la incidencia de FocR4T en campo (Xue *et al.*, 2015). Por otra parte, *B. amyloliquefaciens* W19 redujo 42.8 y 44.4% la incidencia de Foc en dos campos de banano Cavendish (Wang *et al.*, 2016); además, *B. subtilis* N11 redujo 82.1% la incidencia de FocR4T, mientras que la combinación de *Paenibacillus polymyxa* SQR21 + *Trichoderma harzianum* T37 redujo 64.3% la incidencia de FocR4T, en banana Cavendish (Zhang *et al.*, 2011). Las bacterias *Paenibacillus* sp. BSP.1.1, *Serratia* sp. AC35, *Pseudomonas tolaasii* P61, *Bacillus pumilus* BFIEST 4C, *B. pumilus* R44, *B. pumilus* A1, y *Serratia liquefaciens* CPA C53 inhibieron el crecimiento micelial *in vitro* de cinco aislamientos de Foc Raza “1 o 2” en 46.6, 26.6, 12.0, 11.9, 10.1, 9.7 y 4.9%, respectivamente (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022). Por lo anterior, la presente investigación evaluó el efecto *in vitro* de cinco bacterias antagonistas sobre el desarrollo micelial de FocR2, como hongo fitopatogénico modelo, dada su presencia en el país, para valorar su aplicación potencial en futuros esquemas de manejo fitosanitario, ante una eventual introducción de FocR4T a nuestro país.



“1 or 2” isolates at 46.6, 26.6, 12.0, 11.9, 10.1, 9.7 and 4.9%, respectively (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022).

Therefore, the present investigation evaluated the *in vitro* effect of five antagonistic bacteria on the mycelial development of FocR2, as a model phytopathogenic fungus, given its presence in the country, to assess its potential application in future phytosanitary management schemes, in the event of a possible introduction of FocR4T to our country.

**Phylogenetic analysis.** To determine the race to which the isolates evaluated in the present study belong (Table 1), the same methodology reported by Florencio-Anastasio *et al.* (2022), phylogenetic analysis of the IGS (Intergenic spacers) region of the rDNA amplified with the primers PNFo and PN22 (Edel *et al.*, 1995) was performed.

**FocR2 isolates.** The fungi isolates were donated by Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Which were isolated from banana plantations in Hueytamalco, Puebla (MIC17188; MIC17189; MIC17190), Tacámbaro, Michoacán (MIC17191) and Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca (MIC17192), from samples of individual plants

**Análisis filogenético.** Con la finalidad de determinar la raza a la cual pertenecen los aislamientos evaluados en el presente estudio (Cuadro 1), se siguió la misma metodología reportada por Florencio-Anastasio *et al.* (2022), se realizó el análisis filogenético de la región IGS (Intergenic spacers) del rDNA amplificada con los iniciadores PNFo y PN22 (Edel *et al.*, 1995).

**Aislamientos FocR2.** Los aislamientos del hongo fueron donados por el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Los cuales fueron aislados de plantaciones bananeras de Hueytamalco, Puebla (MIC17188; MIC17189; MIC17190), Tacámbaro, Michoacán (MIC17191) y Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca (MIC17192), a partir de muestras de plantas individuales colectadas por el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (PVEF) para la vigilancia y detección oportuna de FocR4T. Las muestras colectadas consistieron en fragmentos de 5 x 1.5 cm de haces vasculares de plantas plátano con síntomas de amarillamiento.

**Cepas bacterianas evaluadas.** Para el bioensayo 1, se utilizaron las cepas bacterianas *Bacillus sub-*

**Table 1. Origin of the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 2, deposited in the collection of Laboratorio de Micología, del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-Senasica) (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022).**

**Cuadro 1. Origen de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 2, depositadas en la colección del Laboratorio de Micología, del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-Senasica) (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022).**

| Aislamientos  | Municipio / Estado                           | Latitud  | Longitud   | No. de accesión |
|---------------|----------------------------------------------|----------|------------|-----------------|
| CNRF-MIC17188 | Hueytamalco, Puebla                          | 20.00857 | -97.24197  | MN702818        |
| CNRF-MIC17189 | Hueytamalco, Puebla                          | 20.00882 | -97.2419   | MN702819        |
| CNRF-MIC17190 | Hueytamalco, Puebla                          | 20.00928 | -97.24209  | MN702820        |
| CNRF-MIC17191 | Tacámbaro, Michoacán                         | 19.21827 | -101.45857 | MN702821        |
| CNRF-MIC17192 | Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca | 16.04554 | -97.70423  |                 |

collected by the National Program Phytosanitary Epidemiological Surveillance (PVEF) for surveillance and timely detection of FocR4T. The collected samples consisted of 5 x 1.5 cm fragments of vascular bundles from banana plants with yellowing symptoms.

**Evaluated bacterial strains.** For bioassay 1, the bacterial strains *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO), *B. velezensis* (BAVE) were used, which were provided by Laboratorio de bacterias, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA (Table 2) to evaluate its effect on the mycelial growth of three FocR2 isolates (MIC17188, MIC17191 and MIC17192) (Table 1). On the other hand, in bioassay 2, the bacterial strains *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 and *Serratia* sp. AC 35, which were provided by Laboratorio de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, to determine their influence on the mycelial growth of the FocR2 strain CNRF-MIC17188 (accession number MN702818).

**Bioassay 1. *In vitro* inhibition of bacteria against three isolates of FocR2.** For this bioassay, the antagonistic effect of the bacterial strains: BASU, BASO, BAZE (Table 1) on the mycelial growth of the isolates MIC17188, MIC17191 and MIC17192 (Table 2) was evaluated using the technique

*tilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO), *B. velezensis* (BAVE), las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de bacterias, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA (Cuadro 2) para evaluar su efecto en el crecimiento micelial de tres aislamientos de FocR2 (MIC17188, MIC17191 y MIC17192) (Cuadro 1). Por otra parte, en el bioensayo 2, se utilizaron las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 y *Serratia* sp. AC 35, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, para determinar su influencia en el crecimiento micelial de la cepa FocR2 CNRF-MIC17188 (número de acceso MN702818).

**Bioensayo 1. Inhibición *in vitro* de bacterias contra tres aislamientos de FocR2.** Para este bioensayo se evaluó el efecto antagonista de las cepas bacterianas: BASU, BASO, BAZE (Cuadro 1), sobre el crecimiento micelial de los aislamientos MIC17188, MIC17191 y MIC17192 (Cuadro 2) utilizando la técnica propuesta por (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). Las bacterias se reactivaron en agar nutritivo (Merck®) Se establecieron cuatro tratamientos (tres bacterias más el testigo) con cuatro repeticiones cada uno. En los extremos de las cajas de Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar, Merck®), se colocó una asada (línea de 5 cm) de las cepas bacterianas de siete días de crecimiento.

**Table 2. Origin of the antagonistic bacteria evaluated against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2.**

**Cuadro 2. Origen de las bacterias antagonistas evaluadas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2.**

| Bacteria                   | Clave asignada | Origen de las bacterias |
|----------------------------|----------------|-------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i>   | BASU           | SENASICA                |
| <i>Bacillus sonorensis</i> | BASO           | SENASICA                |
| <i>Bacillus velezensis</i> | BAVE           | SENASICA                |
| <i>Paenibacillus</i> sp.   | BSP 1.1        | COLPOS                  |
| <i>Serratia</i> sp.        | AC 35          | COLPOS                  |

proposed by (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). The bacteria were reactivated in nutrient agar (Merck®). Four treatments were established (three bacteria plus the control) with four repetitions each. At the ends of the Petri dishes with PDA medium (Potato Dextrose Agar, Merck®), a streak (5 cm line) of the seven-day-old bacterial strains was placed. The Petri dishes were incubated in the dark at  $28 \pm 2$  °C for 24 h; Subsequently, 7 mm diameter agar disks of each FocR2 isolate were placed, which were removed from the margins of the seven-day-old fungal cultures and placed on the opposite side of each Petri dish, 5 cm from each other. distance from bacterial growth. The control consisted of only placing fungal growth disks in PDA culture medium. The dishes were incubated again in dark at  $28 \pm 2$  °C; at 3, 7, 10 and 14 days after sowing, the radius of mycelial growth of each fungal isolate was measured, four measurements of fungal growth were taken with a vernier, to calculate the percentage of inhibition by utilizing the reported formula was used by Landa *et al.* (1997):

$$\text{Percentage of inhibition} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

Where, r is the growth radius of the fungus in the presence of the bacteria and R is the growth radius of the fungus without the bacteria (control).

**Bioassay 2. *In vitro* inhibition of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. against the FocR2 isolate MIC17188 at three pre-inoculation times.** In this bioassay, the inhibitory effect *in vitro* of the bacterial strains *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. (AC 35) together and separately (Table 1) against the FocR2 isolate MIC17188 (Table 2) was evaluated, in previous studies, this isolate presented a higher *in vitro* growth rate (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022), three different

Las cajas fueron incubadas en oscuridad a  $28 \pm 2$  °C por 24 h; posteriormente, se colocaron discos de agar de 7 mm de diámetro de cada aislamiento de FocR2, los cuales fueron removidos de los márgenes de los cultivos fúngicos de siete días de crecimiento, y se colocaron en el lado opuesto de cada caja, a 5 cm de distancia del crecimiento bacteriano. El testigo consistió en solo colocar discos del crecimiento fúngico en medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron nuevamente en oscuridad a  $28 \pm 2$  °C; a los 3, 7, 10 y 14 días después de la siembra, se midió el radio de crecimiento micelial de cada aislamiento fúngico, se tomaron cuatro mediciones del crecimiento fúngico con un vernier, para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la formula reportada por Landa *et al.* (1997):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

Dónde, r es el radio de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria y R es el radio de crecimiento del hongo sin la bacteria (testigo).

**Bioensayo 2. Inhibición *in vitro* de *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. contra el aislamiento MIC17188 de FocR2 en tres tiempos de pre-inoculación.** En este bioensayo se evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. (AC 35) juntas y separadas (Cuadro 1) contra el aislamiento MIC17188 de FocR2 (Cuadro 2), en estudios previos, dicho aislamiento presentó mayor ritmo de crecimiento *in vitro* (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022), se evaluaron tres diferentes tiempos de pre-inoculación a 2, 4 y 7 días de pre-inoculación (DPI) en el medio de cultivo (pre-inoculación se refiere a la siembra de las bacterias en la caja de Petri previo a la siembra de los aislamientos del hongo, con la finalidad de que las bacterias produzcan y secreten

pre-inoculation times at 2, 4 and 7 days of pre-inoculation (DPI) in the culture medium (pre-inoculation means to the seeding of the bacteria in the Petri dish prior to seeding the isolates of the fungus, in order to allow the bacteria to produce and secrete antifungal metabolites). The same inoculation procedure described in Bioassay 1 was used. A 7 mm disk of the fungus was placed in the center of the Petri dish and 5-cm streak of the bacterial strains were placed at opposite ends, in such a way that the bacterial growth was initially separated 3 cm from the fungus and 6 cm from each other. Four replicates were established for each treatment, including the control which consisted of a 7 mm disk of the fungus, and the Petri dishes were incubated again in the dark at  $28 \pm 2$  °C. The radius of mycelial growth of the isolation of the fungus was measured at 2, 4, 6 and 7 days.

**Experimental design and statistical analysis.** For each trial, a completely randomized experimental design was established and they were performed separately, to avoid possible cross effects due to volatile compounds produced by antagonistic bacteria. The inhibition data were analyzed with the statistical package SAS for Windows (SAS Institute Inc, 2002), performing an analysis of variance and Tukey's mean comparison test ( $\alpha \leq 0.05$ ).

**Phylogenetic analysis.** BLAST analysis of the consensus sequences of the isolates MIC17188, MIC17189, MIC17190 (Hueytamalco, Puebla) and MIC17191 (Tacámbaro, Michoacán) confirmed the identity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 with 100 % cover and grouped with the race within Clade VI proposed by Fourie *et al.* (2009) and Karangwa *et al.* (2018) (Figure 1).

**Bioassay 1. *In vitro* inhibition of bacteria against three isolates of Foc R2.** The BASU bacterial

metabolites antifúngicos). Se utilizó el mismo procedimiento de inoculación descrito en el Bioensayo 1. Se colocó un disco de 7 mm del hongo en el centro de la caja de Petri y se colocaron asadas de 5 cm de las cepas bacterianas en extremos opuestos, de tal manera que el crecimiento bacteriano quedó separado inicialmente a 3 cm del hongo y a 6 cm entre sí. Se establecieron cuatro repeticiones por cada tratamiento, incluyendo el testigo el cual consistió de disco de 7 mm del hongo, y las cajas de Petri se incubaron nuevamente en oscuridad a  $28 \pm 2$  °C. Se midió el radio de crecimiento micelial del aislamiento del hongo a los 2, 4, 6 y 7 días.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Para cada ensayo se estableció un diseño experimental completamente al azar y se realizaron por separado, para evitar posibles efectos cruzados por compuestos volátiles producidos por bacterias antagonistas. Los datos de inhibición se analizaron con el paquete estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc, 2002), realizando un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ).

**Análisis filogenético.** El análisis BLAST de las secuencias consenso de los aislamientos MIC17188, MIC17189, MIC17190 (Hueytamalco, Puebla) y MIC17191 (Tacámbaro, Michoacán) permitió confirmar la identidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 con 100 % de cobertura y agrupadas con la raza dentro del Clado VI propuesto por Fourie *et al.* (2009) y Karangwa *et al.* (2018) (Figura 1).

**Bioensayo 1. Inhibición *in vitro* de bacterias contra tres aislamientos de Foc R2.** La cepa bacteriana BASU fue la que provocó la inhibición mayor del desarrollo micelial de los tres aislamientos de FocR2, con un 55.1% en promedio, a los 14 días de la confrontación. Por su parte, las cepas BAVE y

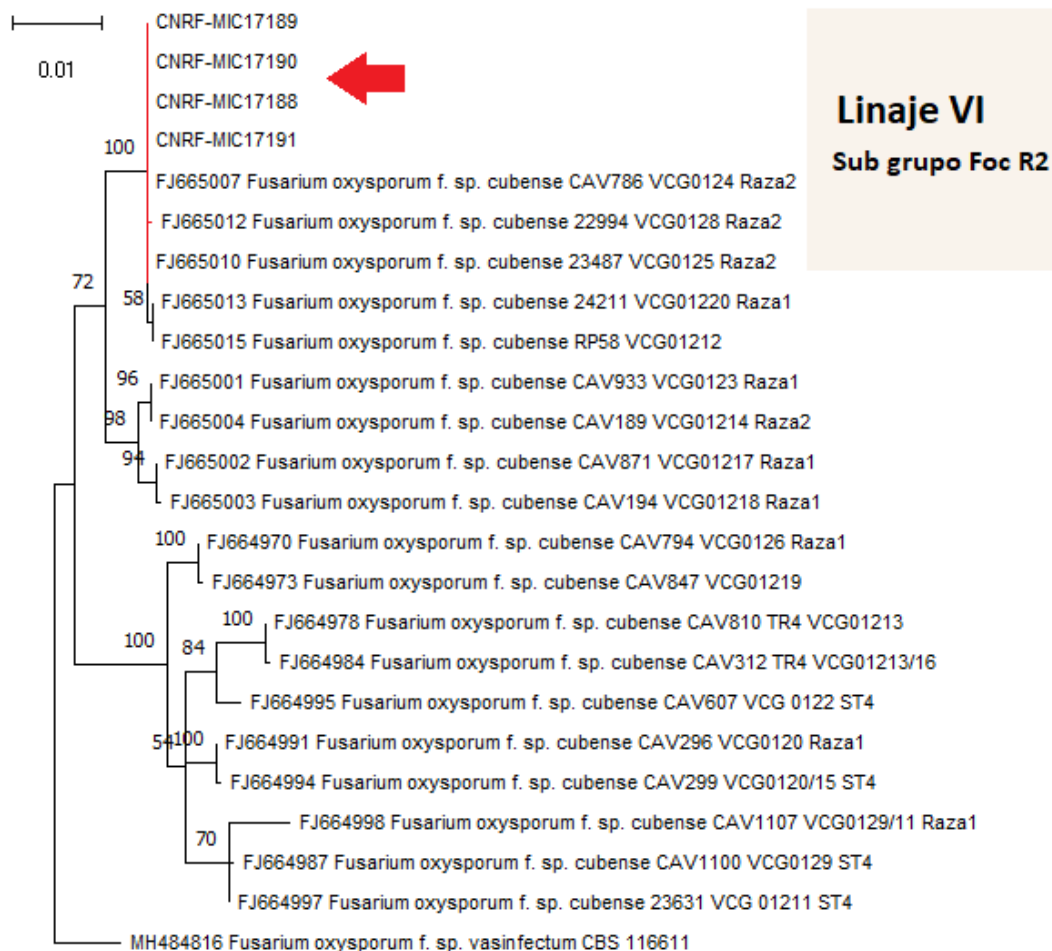


Figure 1. Phylogenetic analysis of four isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (MIC17188, MIC17189, MIC17190, MIC17191) from Puebla and Michoacan, Mexico.  
 Figura 1. Análisis filogenético de cuatro aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (MIC17188, MIC17189, MIC17190, MIC17191) de Puebla y Michoacán, México.

strain was the one that caused the greatest inhibition of mycelial development of the three FocR2 isolates, with an average of 55.1%, 14 days after the confrontation. On the other hand, the BAVE and BASO strains showed an average inhibition percentage of 45.8 and 21.7%, respectively (Table 3; Figures 2 and 3).

**Bioassay 2. *In vitro* inhibition of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. against the FocR2**

BASO mostraron un porcentaje de inhibición promedio de 45.8 y 21.7%, respectivamente (Cuadro 3; Figuras 2 y 3).

**Bioensayo 2. Inhibición *in vitro* de *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. contra el aislamiento MIC17188 de FocR2 en tres tiempos de pre-inoculación.** A los 7 días de evaluación, la cepa bacteriana *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, por si sola tuvo el mayor efecto inhibitorio en el crecimiento



**Table 3. Comparative fungal inhibitions (average of the three strain isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2) obtained from fungal confrontations with three bacteria, 14 days after evaluation.**

**Cuadro 3. Inhibiciones fúngicas comparativas (promedio de los tres aislamientos cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2) obtenidas de confrontaciones fúngicas con tres bacterias, a los 14 días de evaluación.**

| Bioensayo 1                       | Inhibición fúngica <sup>z</sup> (%) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> (BASU)   | 55.1 a                              |
| <i>Bacillus velezensis</i> (BAVE) | 45.8 b                              |
| <i>Bacillus sonorensis</i> (BASO) | 21.7 c                              |

<sup>z</sup>Values estimated from the control fungal growth data for the corresponding bioassay. Identical letters are not significantly different (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ),  $n=4$ . / <sup>z</sup>Valores estimados a partir de los datos de crecimiento fúngico del testigo para el bioensayo correspondiente. Las letras idénticas no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ),  $n=4$ .

**isolate MIC17188 at three pre-inoculation times.** After 7 days of evaluation, the bacterial strain *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, by itself, had the greatest inhibitory effect on the mycelial growth of the MIC17188 isolate at 4 and 7 DPI of 75.9 and 80.1%, respectively, followed by the combination of *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 + *Serratia* sp. AC35 whose inhibition was 52.7 and 75.5%, respectively; While the bacterial strain *Serratia* sp. AC35 presented inhibition values of 46.8 and 52.3% on the same pre-inoculation dates (Table 4; Figure 4).

The *in vitro* inhibition capacity of the BASU, BAVE and BASO bacterial strains considered in this work had not been previously determined against any pathogen; these strains inhibited the mycelial growth of three FocR2 strains, by 40.87% in average, being BASU (55.1%) and BAVE (45.8%) the most effective, while BASO showed the least effectiveness (21.7%). There are reports indicating that several bacterial strains of *B. subtilis* exert *in vitro* inhibition towards *F. oxysporum* and at the same time reduce the incidence of FocR1 when inoculated into vitroplants of banana variety red banana (AAA) under greenhouse conditions

micelial del aislamiento MIC17188 a los 4 y 7 DPI de 75.9 y 80.1%, respectivamente, seguido de la combinación de *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 + *Serratia* sp. AC35 cuya inhibición fue de 52.7 y 75.5%, respectivamente; Mientras que la cepa bacteriana *Serratia* sp. AC35 presentó valores de inhibición del 46.8 y 52.3% en las mismas fechas de pre-inoculación (Cuadro 4; Figura 4).

La capacidad de inhibición *in vitro* de las cepas bacterianas BASU, BAVE y BASO consideradas en este trabajo, no se había determinado previamente contra ningún patógeno; estas cepas inhibieron el crecimiento micelial de tres cepas de FocR2, en 40.87% en promedio, siendo las más efectivas BASU (55.1%) y BAVE (45.8%), en tanto que BASO mostró la menor efectividad (21.7%). Existen reportes donde indican que varias cepas bacterianas de *B. subtilis* ejercen inhibición *in vitro* hacia *F. oxysporum* y a la vez reducen la incidencia de FocR1 cuando se inoculan en vitroplantas de banana variedad Red banana (AAA) en condiciones de invernadero ya sea solas o en combinación con *Pseudomonas fluorescens* Pfl (Rubio-Tinajero *et al.*, 2021; Kavino y Manoranjitham, 2018). De

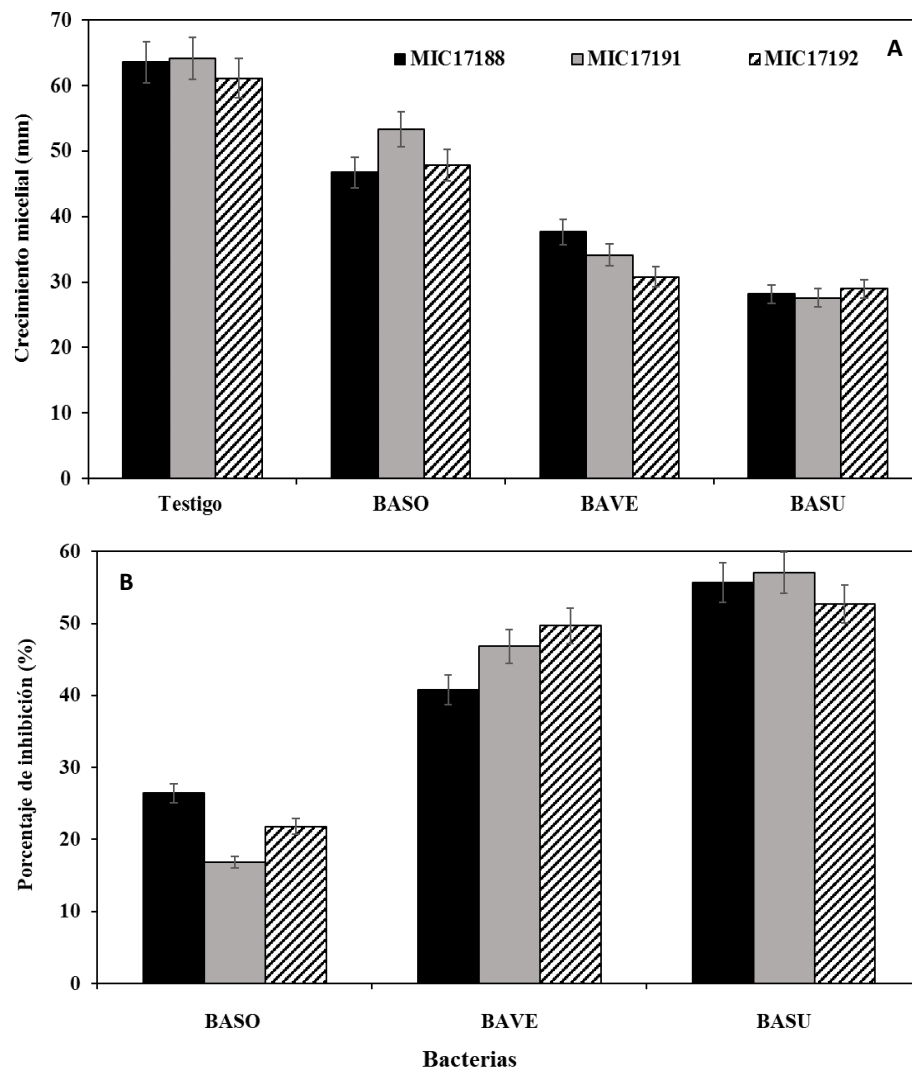


Figure 2. *In vitro* inhibition of *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO), and *B. velezensis* (BAVE) against the isolates MIC17188, MIC17191, and MIC17192 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2, after 14 days of evaluation. A) Mycelial growth, and B) Percentage of inhibition. Means±Standard error. n=4.

Figura 2. Inhibición *in vitro* de *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO), y *B. velezensis* (BAVE) contra los aislamientos MIC17188, MIC17191 y MIC17192 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2, a los 14 días de evaluación. A) Crecimiento micelial, y B) Porcentaje de inhibición. Medias±Error estándar. n=4.

either alone or in combination with *Pseudomonas fluorescens* Pfl (Rubio-Tinajero *et al.*, 2021; Kavino and Manoranjitham, 2018). Similarly, the effectiveness of *B. subtilis* has been evaluated in *in vivo* trials, based on its ability to reduce the incidence of *F. oxysporum* in *Dioscorea villosa* tubers (Khan *et al.*, 2017). Some species of *B.*

igual forma, la efectividad de *B. subtilis* se ha evaluado en ensayos *in vivo*, con base en su capacidad de reducir la incidencia de *F. oxysporum* en tubérculos de *Dioscorea villosa* (Khan *et al.*, 2017). En particular algunas especies de *B. velezensis* han mostrado cierta efectividad en la reducción de la incidencia de *F. oxysporum* en plántulas de banano,

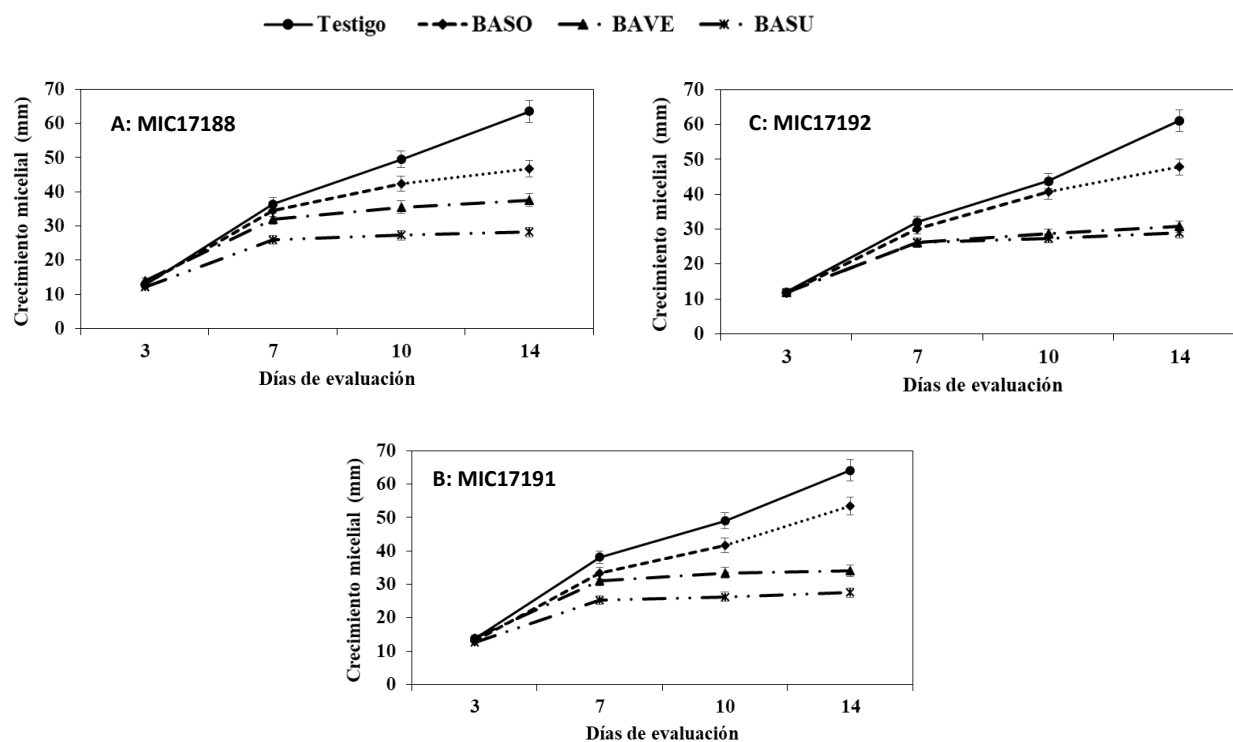


Figure 3. *In vitro* mycelial growth of the isolates MIC17188, MIC17191 and MIC17192, of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 in the presence of *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO) and *B. velezensis* (BAVE) bacteria, at 3, 7, 10 and 14 days of evaluation. Means  $\pm$  Standard error. n=4.

Figura 3. Crecimiento micelial *in vitro* de los aislamientos MIC17188, MIC17191 y MIC17192, de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 en presencia de las bacterias *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO) y *B. velezensis* (BAVE), a los 3, 7, 10 y 14 días de evaluación. Medias  $\pm$  Error estándar. n=4.

Table 4. Inhibitory effect of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1), *Serratia* sp. (AC 35) and its combination, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 (MIC17188), with seven days of bacterial pre-inoculation and seven days of confrontation.

Cuadro 4. Efecto inhibitorio de *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1), *Serratia* sp. (AC 35) y su combinación, contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 (MIC17188), con siete días de pre-inoculación bacteriana y siete días de confrontación.

| Tratamiento     | Inhibición fúngica (%)* |
|-----------------|-------------------------|
| BSP 1.1         | 80.15 a                 |
| BSP 1.1 + AC 35 | 75.51 b                 |
| AC 35           | 52.31 c                 |

\*Estimated value from the fungal growth of the control of the corresponding bioassay. Identical letters in the column are not significantly different (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). n=3. / \*Valor estimado a partir del crecimiento fúngico del testigo del bioensayo correspondiente. Letras idénticas en la columna no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). n=3.

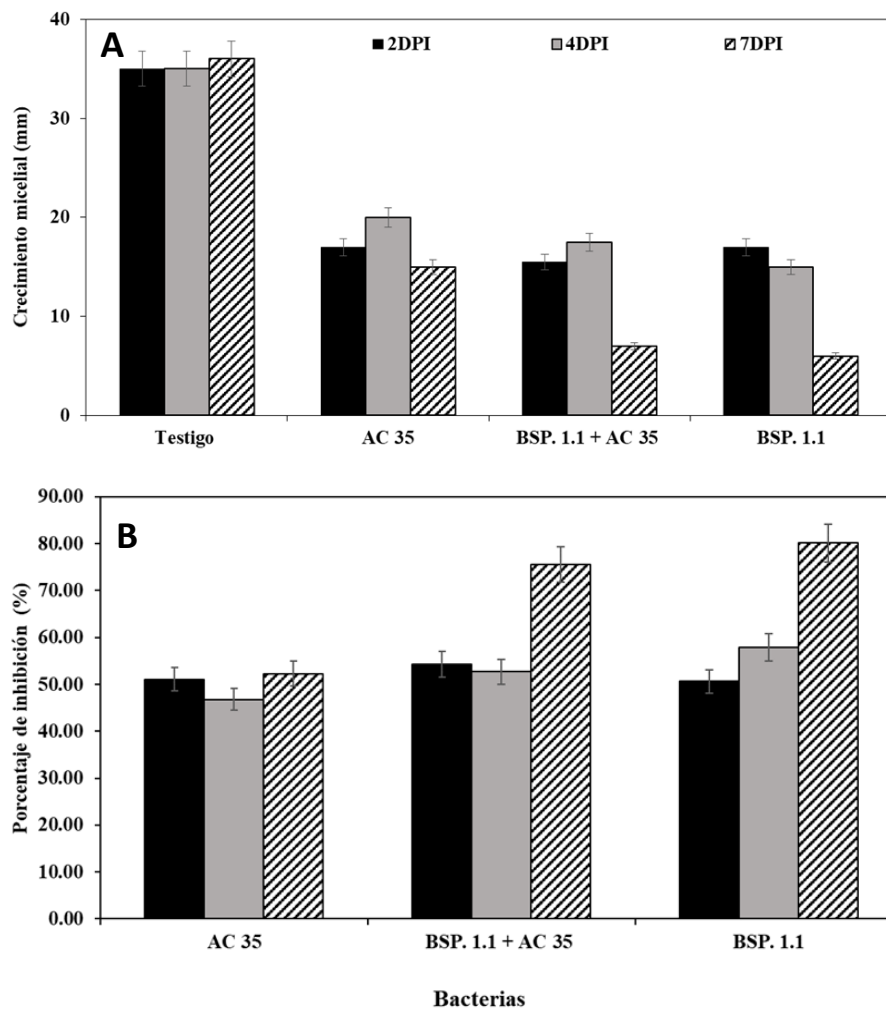


Figure 4. *In vitro* inhibition of the bacteria *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. (AC35) against the isolate MIC17188 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* at three times of bacterial inoculation (two, four and seven days). A) Mycelial growth, and B) Percentage of inhibition. After seven days of evaluation. Means + Standard error. n=3.

Figura 4. Inhibición *in vitro* de las bacterias *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. (AC35) contra el aislamiento MIC17188 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* a tres tiempos de inoculación bacteriana (dos, cuatro y siete días). A) Crecimiento micelial, y B) Porcentaje de inhibición. A los siete días de evaluación. Medias ± Error estándar. n=3.

*velezensis* have shown some effectiveness in reducing the incidence of *F. oxysporum* in banana seedlings, under greenhouse conditions (Cao *et al.*, 2018), and especially the incidence of FocR4T in plants of Cavendish banana var. Brazil (Huang *et al.*, 2019). This agrees with that report from Segura-Mena *et al.* (2021) who mention that the

en condiciones de invernadero (Cao *et al.*, 2018), y de manera especial la incidencia de FocR4T en plantas de banano Cavendish var. Brazil (Huang *et al.*, 2019). Lo anterior concuerda con lo reportado por Segura-Mena *et al.* (2021) quienes mencionan que la utilización de bacterias benéficas/antagonistas son parte de prácticas de manejo del suelo para

use of beneficial/antagonistic bacteria are part of soil management practices to reduce the incidence and severity of diseases caused by *Fusarium*.

The results obtained suggest that *B. subtilis* and *B. sonorensis* could potentially be evaluated in greenhouse and later in the field, to be considered in the future as part of a management program against FocR2 and against FocR4T, before an eventual introduction of it; either through bacterization practices of plantain vitroplants before their establishment in the field or in the preparation of biofertilizer formulations that could be applied once the crop is established in the field, as has already been reported by Kavino and Manoranjitham (2018) and Huang *et al.* (2019).

Regarding the inhibition of mycelial growth of FocR2 MIC17188, a previous study showed that the bacterial strains *Paenibacillus* sp. BSP1.1 and *Serratia* sp. AC35 exerted an inhibition of 45 and 27% when pre-inoculated one day before the fungal confrontation (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022); in the present work, this inhibition increased to 80.1 and 52.3%, respectively, when the bacteria were pre-inoculated *in vitro*, seven days before the confrontation, which suggests that the longer the bacteria have to establish themselves in the culture medium, the greater the inhibitory effect. This gives consistency to what was suggested by Caballero-Hernández (2011) when recommending the protection of banana plants with antagonistic bacteria applied seven days before the inoculation of the pathogen.

Furthermore, the strain *Paenibacillus* sp. BSP1.1 has also been effective in inhibiting the mycelial growth of *Rhizoctonia* sp. (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019), this bacterial strain is attractive for its biotechnological use as part of an integrated management program for the biocontrol of Foc, due to the high percentage of inhibition against five isolates of Foc Race “1 or 2” (Florencio-Anastasio

reducir la incidencia y severidad de enfermedades causadas por *Fusarium*.

Los resultados obtenidos sugieren que *B. subtilis* y *B. sonorensis* podrían ser potencialmente evaluadas en invernadero y posteriormente en campo, para en un futuro también ser consideradas como parte de un programa de manejo contra FocR2 y contra FocR4T, ante una eventual introducción de este último; ya sea mediante prácticas de bacterización de vitroplantas de plátano antes de su establecimiento en campo o en la elaboración de formulaciones de biofertilizantes que se podrían aplicar una vez que el cultivo está establecido en campo, como ya ha sido reportado por Kavino y Manoranjitham (2018) y Huang *et al.* (2019).

Respecto a la inhibición del crecimiento micelial de FocR2 MIC17188, un estudio previo, demostró que las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. BSP1.1 y *Serratia* sp. AC35 ejercieron una inhibición de 45 y 27% cuando se preinocularon un día antes de la confrontación fúngica (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022); en el presente trabajo, esta inhibición se incrementó hasta 80.1 y 52.3%, respectivamente, cuando las bacterias se preinocularon *in vitro*, siete días antes de la confrontación, lo que sugiere que entre más tiempo tengan las bacterias para establecerse en el medio de cultivo, mayor será el efecto inhibitorio. Lo anterior, da consistencia a lo sugerido por Caballero-Hernández (2011) al recomendar la protección de plantas de banano con bacterias antagonistas aplicadas siete días antes de la inoculación del patógeno.

Además, la cepa *Paenibacillus* sp. BSP1.1 también ha sido eficaz para inhibir el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* sp. (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019), esta cepa bacteriana es atractiva para su utilización biotecnológica como parte de un programa de manejo integrado para el biocontrol de Foc, debido a alto porcentaje de inhibición contra cinco aislamientos de Foc Raza “1 o 2” (Florencio-



*et al.* 2022). In addition, this bacterium produces auxins and indoles, and solubilizes phosphates, which is why it is considered a good promoter of plant growth and improves seed germination and the growth of *Capsicum annum* plants (Angulo-Castro *et al.*, 2018; Pineda-Mendoza, 2015; Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). Therefore, *Paenibacillus* sp. BSP1.1 can potentially be used in biological control programs as a “bacterization practice” one week before its establishment in the field to induce greater protection in plantain and banana vitroplants.

## CONCLUSIONS

The bacterial strain *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, by itself, had the greatest inhibitory effect on the mycelial growth of the FocR2 isolate MIC17188 when pre-inoculated at seven days.

The inhibitory effect of the combined inoculation of the bacterial strains *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 and *Serratia* sp. AC35 was lower compared to the single inoculation of the *Paenibacillus* sp. BSP 1.1.

## ACKNOWLEDGMENTS

To Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario, Coordinación de Análisis de Riesgo de Plagas y Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) for allowing the use of its facilities for this research.

## LITERATURA CITADA

Aguayo J, Cerf-Wendling I, Folscher AB, Fourier-Jeandel C, Ioos R, Mathews MC, Mostert D, Renault C, Wilson V and Viljoen A. 2021. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 (TR4) causing Banana Wilt in the Island of Mayotte. *Plant Disease* 105(1):219. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32755365/>.  
Angulo-Castro A, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Almaraz-Suárez JJ, Delgadillo-Martínez J, Jiménez-Fernández

Anastasio *et al.* 2022). Además, esta bacteria produce auxinas e indoles, y solubiliza fosfatos, por lo que se considera un buen promotor del crecimiento vegetal y mejora la germinación de semillas y el crecimiento de plantas de *Capsicum annum* (Angulo-Castro *et al.*, 2018; Pineda-Mendoza, 2015; Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). Por lo tanto, *Paenibacillus* sp. BSP1.1 potencialmente puede utilizarse en programas de control biológico como “práctica de bacterización” una semana antes de su establecimiento en campo para inducir mayor protección a vitroplantas de plátano y banano

## CONCLUSIONES

La cepa bacteriana *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, por sí sola tuvo el mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial del aislamiento MIC17188 de FocR2 cuando se pre-inoculó a los siete días.

El efecto inhibitorio de la inoculación combinada de las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 y *Serratia* sp. AC35 fue menor en comparación con la sola inoculación de la cepa *Paenibacillus* sp. BSP 1.1.

## Agradecimientos

A la Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario, Coordinación de Análisis de Riesgo de Plagas y Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) por facilitar el uso de sus instalaciones para esta investigación.

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

M y García-Barradas O. 2018. Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plántulas de 2 variedades de *Capsicum annum* L. inoculadas con rizobacterias u hongos micorrícicos arbusculares. *Revista Argentina de Microbiología* 50(2):178-188. <https://doi.org/10.1016/j>

- ram.2017.03.011.
- Ashby SF. 1913. Banana disease in Jamaica. Bulletin of the Department of Agriculture Jamaica 2(6): 95-128. <https://naldc-legacy.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=12088&content=PDF>.
- Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Cabanás CGL and Mercado-Blanco J. 2019. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology* 10:616. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00616/full>.
- Caballero-Hernández AJ. 2011. Uso de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp. para el biocontrol del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza tropical 1 en vitropantallas del cultivar Gros Michel (AAA). Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Escuela de Posgrado. 90 p. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/5623>.
- Cao Y, Pi H, Chandransu P, Li Y, Wang Y, Zhou H, Xiong H, Helmann JD and Cai Y. 2018. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports* 8:4360. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>.
- Cook DC, Taylor AS, Meldrum RA and Drenth A. 2015. Potential economic impact of panama disease (tropical race 4) on the Australian banana industry. *Journal of Plant Disease Protection* 122(5/6):229-237. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03356557>.
- Dita RMA, Echegoyén RPE y Pérez VLF. 2013. Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en un país de la región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). San Salvador, El Salvador. 155p. https://www.researchgate.net/profile/Plutarco_Echegoyen/publication/256547836_Plan_de_contingencia_ante_un_brote_de_la_raza_4_tropical_de_Fusarium_oxysporum_f_sp_cubense_en_un_pais_de_la_region_del_OIRSA/links/02e7e5236098aa1954000000.pdf
- Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ES and Staver CP. 2018. *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable management. *Frontiers in Plant Science* 9(1468). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6202804/>.
- DOA. 2019. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in Thailand. Department of Agriculture (DOA) of Thailand. Pest Reports from Thailand. International Plant Protection Convention. <https://www.ippc.int/en/countries/thailand/pestreports/2019/11/detection-of-fusarium-oxysporum-f-sp-cubense-tropical-race-4-in-thailand/>.
- Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579-585. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Ar-ticles/Phyto85n05_579.PDF.
- Florencio-Anastasio JG, García-Ávila CJ, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Quezada-Salinas A, Almaraz-Suárez JJ, Moreno-Velázquez M and Hernández-Ramos L. 2022. Effectiveness of antagonistic bacteria, commercial fungicides, and fourth generation quaternary ammonium salts, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race “1 or 2”. *European Journal of Plant Pathology* 163:719–731. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02510-0>.
- Fish S. 1970. The history of plant pathology in Australia. *The Annual Review of Phytopathology* 8:13-36. <https://appsnet.org/History/THE%20HISTORY%20OF%20PLANT%20PATH-OLOGY%20IN%20AUSTRALIA.pdf>.
- Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR and Viljoen A. 2009. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (14): 4770-4781. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708428/>.
- García-Bastidas FA, Quintero-Vargas JC, Ayala-Vásquez M, Schermer T, Seidl MF, Santos-Paiva M, Noguera AM, Aguilera-Gálvez C, Wittenberg A, Hofstede R, Sorensen A and Kema HJ. 2020. First report of *Fusarium* Wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease* 104(3): 994. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>.
- Ho YN, Chiang HM, Chao CP, Su CC, Hsu HF, Guo CT, Hsieh JL and Huang CC. 2015. *In planta* biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant Soil* 387: 295-306. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11104-014-2297-0.pdf>.
- Huang J, Pang Y, Zhang F, Huang Q, Zhang M, Tang S, Fu H and Li P. 2019. Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. *European Journal of Plant Pathology* 154: 585-596. <https://link.springer.com/article/10.1007/s2F510658-019-01683-5>.
- ICA. 2019. Resolución No. 00011912. Por medio de la cual se declara el estado de emergencia fitosanitaria en el territorio nacional por la presencia de la enfermedad conocida como marchitez de las musáceas por Foc R4T. Instituto Colombiano Agropecuario. 22 p. <https://www.ica.gov.co/getattachment/499e9fe5-1c2c-482a-87a9-62ae25f02f53/2019R11912.aspx>.
- Karangwa P, Monster D, Ndayanzamaso P, Dubois T, Niere B, Felde AZ, Shouten A, Blomme G, Beed F and Viljoen A. 2018. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in East and Central Africa. *Plant Disease* 102: 552-560. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0282-RE>.
- Kavino M and Manoranjitham SK. 2018. *In vitro* bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: Novel ways to combat *Fusarium* wilt. *European Journal of Plant Pathology*

- 151: 371-387. <https://en.xmol.com/paper/article/1335489338024620155>.
- Khan N, Maymon M and Hirsch AM. 2017. Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. *Microorganism* 5:75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040075>.
- Landa B, Hervás A, Bettioli W and Jiménez-Díaz R. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25:305-318. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/12764/1/1997AP039BettioliAntagonistic3360.PDF>.
- Orozco-Santos M. 2013. Historia y situación actual del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: S35. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/suplemento.pdf>.
- Özarslandan M and Akgül DS. 2020. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 causing *Fusarium* wilt disease of banana in Turkey. *Plant Disease* 104(3):974. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1881-PDN>.
- Pineda-Mendoza DY. 2015. Potencial de tres cepas de rizobacterias como antagonistas de *Rhizoctonia solani* en Chile serrano (*Capsicum annuum* L.). Tesis de maestría en Edafología. Colegio de Posgraduados, Área de Microbiología. Montecillo, Estado de México. México. 60 p.
- Pineda-Mendoza DY, Almaraz JJ, Lara-Hernández ME, Arteaga-Garibay R y Silva-Rojas HV. 2019. Cepas de bacterias aisladas de esporomas de hongos ectomicorrízicos promueven el crecimiento vegetal. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria* 115(1): 4-17. <https://doi.org/10.12706/itea.2018.027>.
- Ploetz RC. 2000. Panama disease: A classic and destructive disease of banana. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2000-1204-01-HM>.
- Ploetz RC. 2005. Panama Disease: An old nemesis rears its ugly head part 2: The Cavendish era and beyond. Online. APSnet Features. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Documents/2005/PanamaDisease2.pdf>
- Ploetz R. 2018. *Fusarium* wilt. pp. 207-228. In: Jones, D.R. (Ed.). *Diseases of Banana, Abacá, and Enset*. CABI publishing. <https://books.google.com.mx/books?id=HeWCDwAAQBAJ&pg=PA210&lpg=PA210&dq=Panama+disease+belice+1913&source=bl&ots=zZ9heNd4FZ&sig=ACfU3U0Ja8JJnKiPwMYIAItIszG364kP7w&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewjixuiVwLrAhVEQ6wKHBRZACMQ6AEwDXoECAGQAQ#v=onepage&q&f=true>.
- Promusa. 2018. TR4 present in the UK (United Kingdom). A global programme for *Musa* improvement (Promusa). <https://www.promusa.org/blogpost580-TR4-present-in-the-UK>.
- Rubio-Tinajero S, Osorio-Hernández E, Estrada-Drouaillet B, Silva-Espinosa JHT, Rodríguez-Mejía MDL and Nava-Juárez RA. 2021. *In vitro* antagonist biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(3): 515-528. <https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3932021/RMF2104-1.pdf>.
- Segura-Mena RA, Stoorvogel JJ, García-Bastidas F, Salacinas-Niez M, Kema GHJ and Sandoval JA. 2021. Evaluating the potential of soil management to reduce the effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana (*Musa* AAA). *European Journal of Plant Pathology* 160:441-455. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02255-2>.
- SENASA. 2021. Primer Reporte sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical, W.C. Snyder & H.N. Hansen 1940. Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA). https://assets.ippc.int/static/media/files/pestreport/2021/04/30/Reporte_Foc_R4T_PERU_IPPC_29_abril_2021.pdf.
- Shen Z, Ruan Y, Wang B, Zhong S, Su L, Li R and Shen Q. 2015. Effect of biofertilizer for suppressing *Fusarium* wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial. *Applied Soil Ecology* 93:111-119. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139315001158>.
- SIAP. 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Su HJ, Hwang SC and Ko WH. 1986. *Fusarium* wilt of Cavendish bananas in Taiwan. *Plant Disease* 70(9): 814-818. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Do-cuments/1986Articles/PlantDisease70n09_814.PDF.
- Wang BB, Shen ZZ, Zhang FG, Raza W, Yuan J, Huang R, Ruan YZ, Li R and Shen QR. 2016. *Bacillus amyloliquefaciens* strain W19 can promote growth and yield and suppress *Fusarium* wilt in banana under greenhouse and field conditions. *Pedosphere* 26(5): 733-744. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002016015600832>.
- Xue C, Penton R, Shen Z, Zhang R, Huang Q, Li R, Ruan Y and Shen Q. 2015. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific Reports* 5:11124. <https://www.nature.com/articles/srep11124.pdf>.
- Zhang N, Wu K, He X, Li SQ, Zhang Z H, Shen B, Yang XM, Zhang RF, Huang QW and Shen QR. 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil* 344:87-97. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-0729-7>.