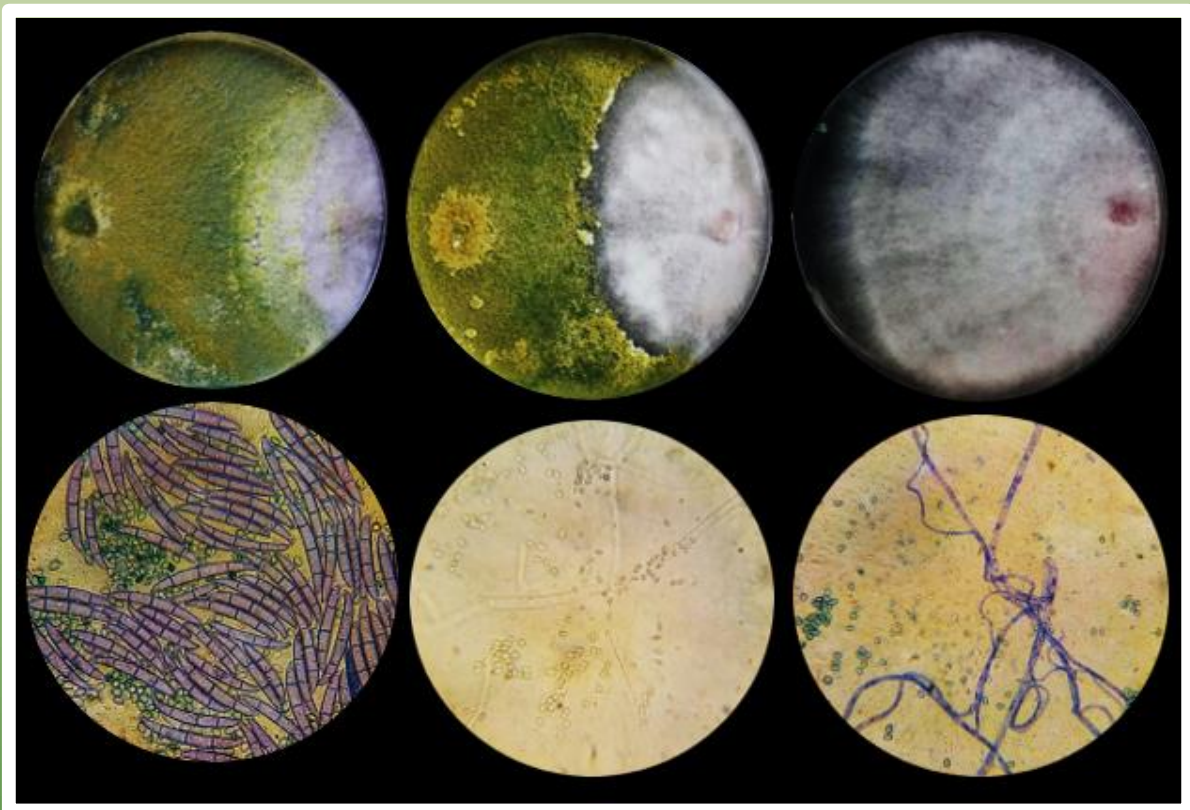


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 39, NÚMERO 2, Mayo 2021



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

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Editora Técnica * Technical Editor

Dra. Norma Ávila Alistac, UACH

Composición Web y RMFito * Web and RMFito Composition

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, COLPOS

Ing. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

Editoras Adjuntas * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, UF, USA

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

Dra. Liliana Carolina Córdova Albores, U de la Salle

Dra. Norma Ávila Alistac, UACH

Dr. Alejandro Tovar Soto, IPN

Dr. Cristian Nava Díaz, COLPOS

Dr. Moisés Camacho Tapia, UACH

Dr. Gilberto Manzo Sánchez, UCol

Dr. José Armando Carrillo Fasio, CIAD

Dr. Ángel Ramírez Suárez, SENASICA

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Sergio de los Santos Villalobos, ITSON

Dr. Alejandro C. Michel Aceves, CSAEGRO

Portada: Antagonismo *In vitro* de *Trichoderma* (micelio verde-amarillo) contra *Fusarium solani* (micelio blanco-rosado) (superior izquierda y centro) y *F. solani* sin interacción (superior derecha). Masa de conidios globosos de *T. harzianum* y macroconidios alantoides de *F. solani* (inferior izquierda); granulación y ruptura de septos de *F. solani* inducida por *T. harzianum* (inferior central); estrangulamiento de hifas de *F. solani* evidenciado por pérdida de turgencia y grosor, por la cepa TH-4 (*T. harzianum*) (inferior derecha).

Original: Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA y Fernández-Pavía SP. Páginas: 237 y 239.

SCIENTIFIC ARTICLES * ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings** * Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco. 228
Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA and Fernández-Pavía SP.
- Efficacy of microbial antagonists and chitin in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in postharvest of mango cv. Azúcar** * Eficacia de antagonistas microbianos y quitina en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en poscosecha de mango cv. Azúcar. 248
Zapata-Narváez YA, Izquierdo-García LF, Botina-Azaín BL and Beltrán-Acosta CR.
- Identification and molecular analysis of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from tomato in Baja California, Mexico** * Identificación y análisis molecular de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* aisladas de jitomate en Baja California, México. 266
Armenta-López SE, Valenzuela-Solano C and Hernández-Martínez R.

PHYTOPATHOLOGICAL NOTES * NOTAS FITOPATOLÓGICAS

- Fungi associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) wilt in Costa Rica** * Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica. 289
Granados-Montero MM, Chaves-Barrantes N, Chaverri P, Hernández-Fonseca JC and Escudero-Leyva E.
- Biocontrol of damping-off of zucchini squash seedlings with *Bacillus subtilis* QST 713** * Biocontrol del ahogamiento de plántulas de calabacita con *Bacillus subtilis* QST 713. 302
Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG, Núñez-Pastrana R, Quezada-Salinas A and Márquez-Licona G.

- In vitro* control of *Fusarium* sp. associated with onion crop through *Trichoderma harzianum*** * Control *in vitro* de *Fusarium* sp. asociado al cultivo de cebolla mediante *Trichoderma harzianum*. 314
Martínez-Salgado SJ, Andrade-Hoyos P, Romero-Arenas O, Villa-Ruano N, Landeta-Cortés G and Rivera-Tapia JA.
- Etiology of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico** * Etiología de la costra negra del nopal (*Opuntia ficus-indica*) en México. 329
Laureano-Ahuelicán B, Moreno-Velázquez M, Hernández-Ramos L, Alvarado-Rosales D, Martínez-Domínguez E, Saavedra-Romero LL and Quezada-Salinas A.
- Verbesina sphaerocephala* extracts promote the development of *Cucumis sativus* and reduce the damage caused by *Meloidogyne incognita*** * Extractos de *Verbesina sphaerocephala* promueven el desarrollo de *Cucumis sativus* y reduce el daño causado por *Meloidogyne incognita*. 339
Velasco-Ramírez AP, Virgen-Calleros G, Hernández-Herrera RM, Velasco-Ramírez A, Corona-Cervantes MP, Munguía-Lizalde DM and Hernández-Pérez AR.
- Housekeeping genes selection for gene expression on *Citrus sinensis* infected with CLAs or CTV using RT-qPCR** * Selección de genes de referencia en expresión génica de *Citrus sinensis* infectados con CLAs o CTV mediante RT-qPCR. 354
Triana-Gutiérrez RI, Gutiérrez-Espinosa MA, Mora-Aguilera G, Cano-Medrano R and Velázquez-Monreal JJ.

Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings

Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco

Leydi Miguel-Ferrer, Omar Romero-Arenas*, Petra Andrade-Hoyos, Primo Sánchez-Morales, Centro de Agroecología, José Antonio Rivera-Tapia, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias (ICUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); Edificio VAL 1, Km 1,7 carretera a San Baltazar Tetela, San Pedro Zacachimalpa, C.P. 72960, Puebla, México; Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Laboratorio de Patología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5, Tarímbaro, Michoacán. C.P. 58880. *Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Recibido: 25 de Enero, 2021.

Aceptado: 18 de Marzo, 2021.

Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA and Fernández-Pavía SP. 2021. Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 228-247.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>

Primera publicación DOI: 13 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 13, 2021.

Resumen. El chile es la segunda hortaliza de mayor producción en México. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antagónica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma harzianum* (T-H4)

Abstract. Chili is the second largest vegetable in Mexico. The objective of the investigation was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* (T-H4) and *T. koningiopsis* (T-K11) versus *Fusarium solani* (MX-MIC 798) in the germination and establishment of seedling of chili Miahuateco. The dual culture technique was used to determine the percentage of radial growth inhibition (PRGI) of the MX-MIC 798 strain. In addition, the germination percentage in Miahuateco chili seeds was analyzed in nursery, as well as the mortality of seedlings and degree of severity at 40 days after transplantation (dat) in Santa María Tecomavaca, Oaxaca, through biocontrol and chemical control (Mancozeb 80®). The T-H4 strain presented the highest PIRG antagonistic level (53.3%) *in vitro* and class II on

y *T. koningiopsis* (T-K11) versus *Fusarium solani* (MX-MIC 798) en la germinación y establecimiento de plántula de chile Miahuateco. Se utilizó la técnica de cultivo dual para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de la cepa MX-MIC 798. Además, se analizó el porcentaje de germinación en semillas de chile Miahuateco en vivero, así como la mortalidad de plántulas y grado de severidad a los 40 días después del trasplante (ddt) en Santa María Tecomavaca, Oaxaca, a través de biocontrol y control químico (Mancozeb 80[®]). La cepa T-H4 presentó el nivel antagónico PICR más alto (53.3%) *in vitro* y clase II en la escala de Bell, asimismo obtuvo 82% de germinación en semillas de chile Miahuateco en vivero y 48% de mortalidad en campo; de manera que igualó al control químico y superó a *T. koningiopsis* T-K11. La actividad antifúngica de *Trichoderma* spp., ofrecen una alternativa para el biocontrol de la marchitez y necrosis en raíz del cultivo de chile Miahuateco causada por *F. solani* MX-MIC 798.

Palabras clave: Antagonismo, crecimiento micelial, PICR, mortalidad, *Capsicum*.

La diversidad genética de los diferentes tipos de chiles en México es poco estudiada, encontrando que gran variedad de estos son nativos, como los denominados Poblanos (Toledo-Aguilar *et al.*, 2016). En el año 2018, el chile Poblano (*Capsicum annum*) presentó un área de siembra de aproximadamente 17,729.80 ha, con una producción de 391,133.26 t dejando una derrama económica de \$ 3'038,997.37 millones de pesos (SIAP, 2020). El chile poblano tiene gran importancia gastronómica, económica y social por ser un ingrediente básico de platillos tradicionales e influencia culinaria de otros alimentos en el mundo, representando uno de los ejes de desarrollo o aglutinadores de empleo

Bell's scale, also obtained 82% germination in Miahuateco chili seeds in nursery and 48% of field mortality; So, he matched chemical control and beat *T. koningiopsis* T-K11. The antifungal activity of *Trichoderma* spp., They offer an alternative for the biocontrol of the wilt and necrosis as a root in the cultivation of Miahuateco chili caused by *F. solani* MX-MIC 798.

Key words: Antagonism, mycelial growth, PRGI, mortality, *Capsicum*.

The genetic diversity of the different types of chilies in Mexico has been scarcely studied, and a large variety have been found to be native, such as the Poblanos (Toledo-Aguilar *et al.*, 2016). In the year 2018, the Poblano chili (*Capsicum annum*) was found to have been planted in an area of approximately 17,729.80 ha, with a production of 391,133.26 t and an income of \$ 3'038,997.37 pesos (SIAP, 2020). The Poblano chili has great gastronomic, economic and social importance, since it is a basic ingredient of traditional dishes and has a culinary influence on other foods worldwide, being one of the cornerstones of development or providers of jobs and income in the areas (Rodríguez *et al.*, 2007; Pérez-Carrasco *et al.*, 2017).

In the town of Santa María Tecomavaca, in the state of Oaxaca, Mexico, the Miahuateco chili is grown, which is a variety of Poblano chili and the current production in the region is jeopardized by the presence of fungal diseases. The genus *Capsicum* presents a higher fungal incidence in the seedling stage. These diseases are caused by pathogens such as *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* spp., which lead to the loss of over one third of the production of the crop. The main symptom is the premature death of the plants, since it causes the

e ingreso en las regiones (Rodríguez *et al.*, 2007; Pérez-Carrasco *et al.*, 2017).

En la comunidad de Santa María Tecomavaca, en el estado de Oaxaca, México, se cultiva el chile Miahuateco, que es una variedad de chile Poblano y actualmente la producción en la región se ve comprometida por la presencia de enfermedades fungosas. El género *Capsicum* presenta mayor incidencia fungosa en la etapa de plántula, estas enfermedades son causadas por patógenos como *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* spp., que provocan la pérdida de más de un tercio de la producción del cultivo. El principal síntoma es la muerte prematura de las plantas, al causar la obstrucción y desequilibrio del funcionamiento de los haces vasculares, además de presentar defoliación, cambios de color, rizado del follaje, daño a estructuras reproductivas, maduración adelantada e irregular pudrición de la raíz y necrosis en el tallo (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Guenoun *et al.*, 2019). *Fusarium oxysporum* y *F. solani* se han aislado de la pudrición de la corona y la base del tallo de plantas maduras de chile Poblano en vivero, además *F. solani* es el agente causal de marchitez y necrosis en raíz y tallo de chile Chilaca en Queréndaro, Michoacán, México (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Reyes-Tena *et al.*, 2019).

Los productos de síntesis química se han empleado por décadas para el control de estas enfermedades (Gan y Wickings, 2017). Sin embargo, su uso está relacionado con la generación de resistencia en fitopatógenos, daños al ambiente y salud humana (Chen *et al.*, 2014; Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Ante esta situación, el control biológico se considera una práctica eficiente y ecológicamente viable para el desarrollo de una agricultura sostenible (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

El género *Trichoderma* contiene a las especies antagonistas más relevantes para el biocontrol de hongos fitopatógenos, utilizado principalmente

obstrucción and imbalance in the functioning of the vascular bundles, defoliation, color changes, curling of the foliage, damage to reproductive structures, early maturation and irregular rot of the root and necrosis in the stem (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Guenoun *et al.*, 2019). *Fusarium oxysporum* and *F. solani* have been isolated from the rot of the crown and the base of the stem of mature Poblano chili plants in nursery. In addition, *F. solani* is the causal agent of wilting and necrosis in the root and stem of the Chilaca chili in Queréndaro, Michoacán, Mexico (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Reyes-Tena *et al.*, 2019).

The products of chemical synthesis have been used for decades to control these diseases (Gan and Wickings, 2017). However, their use is related to the generation of resistance in phytopathogens, damages to the environment and to human health (Chen *et al.*, 2014; Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). In the light of this situation, biological control is considered an efficient practice and environmentally feasible for the development of sustainable agriculture (Pérez-Torres *et al.*, 2018). The genus *Trichoderma* contains the most relevant antagonistic species for the biocontrol of phytopathogenic fungi, used mainly by organic farmers and in good agricultural practices for the management of diseases and as a compost enhancer (Romero-Arenas *et al.*, 2017; Launio *et al.*, 2020). Its use and success in agriculture is due to action mechanisms such as competition for space, mycoparasitism, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018) and the production of volatile compounds (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). In previous investigations, *T. harzianum* T-H4 presented a higher percentage of inhibition (78.3%) against *Phytophthora cinnamomi* than *T. koningiopsis* T-K11 *in vitro* (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). Likewise, the strain T-H4 presented 63.6% of PICR and class III of the Bell scale against *Fusarium* sp.

por productores orgánicos y de buenas prácticas agrícolas para el manejo de enfermedades y potenciador de compost (Romero-Arenas *et al.*, 2017; Launio *et al.*, 2020). El éxito y uso en la práctica agrícola, se debe a sus mecanismos de acción como la competencia por espacio, micoparasitismo, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018) y la producción de compuestos volátiles (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). En trabajos previos, *T. harzianum* T-H4 presentó el mayor porcentaje de inhibición (78.3%) contra *Phytophthora cinnamomi* que *T. koningiopsis* T-K11 *in vitro* (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). Así mismo la cepa T-H4 presentó 63.6% de PICR y clase III de la escala de Bell contra *Fusarium* sp. (Morales *et al.*, 2020). En consecuencia, el objetivo de este trabajo de investigación fue: Evaluar la actividad antagonista de dos cepas de *Trichoderma* (T-H4 y T-K11), *versus F. solani* MX-MIC 798 en la germinación de semilla y vigor de plántulas de chile Miahuateco para la comunidad de Santa María Tecomavaca, Oaxaca, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antagonismo de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* ante *F. solani* en cultivos duales. La evaluación del antagonismo se realizó con las cepas T-H4 de *T. harzianum* y T-K11 de *T. koningiopsis*, ambas aisladas de la raíz de *Persea americana*, cuyas secuencias se encuentran en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso MK779064.1 y MK791648.1, respectivamente. Así mismo, se utilizó la cepa MX-MIC 798 de *F. solani* con número de acceso MK532475, la cual fue donada por el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana. Todo el material biológico está resguardado en el laboratorio 204 del Eco-Campus

(Morales *et al.*, 2020). Consequently, the aim of this investigation was to evaluate the antagonistic activity of two strains of *Trichoderma* (T-H4 and T-K11), *versus F. solani* MX-MIC 798 in the germination of seeds and vigor of Miahuateco chili seedlings for the town of Santa María Tecomavaca, Oaxaca, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Antagonism of *T. harzianum* and *T. koningiopsis* against *F. solani* in dual cultures. The evaluation of the antagonism was carried out with strains T-H4 of *T. harzianum* and T-K11 of *T. koningiopsis*, both isolated from the root of *Persea americana*, the sequences of which are found in the National Center for Biological Information (NCBI) data base, with accession numbers MK779064.1 and MK791648.1, respectively. Likewise, *F. solani* strain MX-MIC 798, with accession number MK532475 was used, which was donated by the Plant Pathology Laboratory of the Agricultural and Forestry Research Institute of the Universidad Michoacana. All the biological material is stored in laboratory 204 of the Eco-Campus Valsequillo of the Institute of Science of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

For the evaluation of mycelial growth, fragments of *F. solani* (MX-MIC 798), *T. harzianum* (T-H4) and *T. koningiopsis* (T-K11), 5 mm in diameter, were planted in Petri dishes with PDA (Potato Dextrose Agar), each in triplicate and incubated in the dark at 28 °C for 10 days. The mycelial diameter was measured every 12 h to estimate the growth speed (cm), which was calculated with the function of linear growth $y=mx + b$ (where 'y' is distance, 'x' is time and 'b' is the constant factor) and it was expressed in centimeters per day (cm d^{-1}) (Zeravakis *et al.*, 2001). The diameter of the

Valsequillo del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Para la evaluación del desarrollo micelial, se sembraron fragmentos de 5 mm de diámetro de *F. solani* (MX-MIC 798), *T. harzianum* (T-H4) y *T. koningiopsis* (T-K11) en cajas Petri con PDA (Agar de Papa y Dextrosa), cada uno por triplicado y se incubaron en condiciones de oscuridad a 28 °C por 10 días. Se midió el diámetro micelial cada 12 h para estimar la velocidad de crecimiento (cm), la cual se calculó con la función de crecimiento lineal $y=mx + b$ (donde 'y' es la distancia, 'x' es el tiempo y 'b' el factor constante) y se expresó en centímetros por día (cm d^{-1}) (Zeravakis *et al.*, 2001). El diámetro del crecimiento micelial se determinó con un vernier digital (CD-6 Mitutoyo) tomando la misma dirección por triplicado.

La técnica de cultivo dual se utilizó de acuerdo con Andrade-Hoyos *et al.* (2019) por triplicado para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) para cada ensayo evaluado, por un lapso de 10 días con la fórmula $\text{PICR} = [(R1 - R2/R1) \times 100]$. Donde R1 es el diámetro del testigo (promedio del crecimiento radial de los triplicados de cada cepa) y R2: es el diámetro del organismo ensayado. Para complementar las evidencias del antagonismo, se comparó y clasificó cada ensayo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982) (Cuadro 1).

mycelial growth was determined with a digital caliper (CD-6 Mitutoyo) taking the same direction in triplicate.

The dual culture technique was used following Andrade-Hoyos *et al.* (2019) in triplicate to determine the percentage of inhibition of radial growth (PICR) for each trial evaluated, for 10 days using the formula $\text{PICR} = [(R1 - R2/R1) \times 100]$, where R1 is the diameter of the control (average of the radial growth of the triplicates in each strain) and R2 is the diameter of the tested organism. To complement the evidence of the antagonism, each trial was compared and classified using the scale established by Bell *et al.* (1982) (Table 1).

Nursery tests to analyze the percentage of germination and rotting of seedlings. Miahuatenco chili seeds were used, which were provided by farmers from Santa María Tecomavaca in the state of Oaxaca. The trial was held under controlled conditions in the nursery of the Eco-Campus Valsequillo, ICUAP-BUAP. Before the seeds germinated, they were disinfested with sodium hypochlorite at 0.3% (v/v) for 10 min, rinsed three times with sterile water and dried with sterile paper (Illa *et al.*, 2019). The pathogen *F. solani* was inoculated in a salt suspension at a concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1} with a Neubauer chamber (PAUL MARIENFELD), in 400 seeds for each

Cuadro 1. Escala de antagonismos propuesta por Bell *et al.* (1982).
Table 1. Scale of antagonisms proposed by Bell *et al.* (1982).

Clase	Características
I	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió toda la superficie del medio y redujo el crecimiento micelial del patógeno.
II	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió al menos 2/3 partes del medio.
III	<i>Trichoderma</i> spp., y fitopatógeno crecieron 1/2 y 1/2 la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro.
IV	Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de <i>Trichoderma</i> spp.
V	Crecimiento del patógeno que cubrió toda la superficie del medio.

Pruebas en vivero para analizar el porcentaje de germinación y podredumbre de plántulas.

Se utilizaron semillas de chile Miahuateco, proporcionadas por productores de la comunidad de Santa María Tecomavaca en el estado de Oaxaca. El ensayo se llevó bajo condiciones controladas en el vivero del Eco-Campus Valsequillo, ICUAP-BUAP. Previo a la germinación de semillas; estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.3% (v/v) durante 10 min, se enjuagaron tres veces con agua estéril y se secaron con papel estéril (Illa *et al.*, 2019). La inoculación del patógeno *F. solani* se realizó en una suspensión salina estéril a una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} por medio de una cámara de Neubauer (PAUL MARIENFELD), en 400 semillas para cada tratamiento en estudio; una vez impregnado el patógeno y secas las semillas, se procedió a inocular *T. harzianum* y *T. koningiopsis*. La inoculación se realizó a través de una suspensión de teliósporas a una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} para dos tratamientos por separado, cada uno de ellos con 400 semillas (Reyes-Tena *et al.*, 2019).

Una vez inoculados las semillas con los hongos, las semillas se colocaron en charolas germinadoras con Peatmoss y Agrolita (1:1 v/v), previamente esterilizado a 121°C y 15 lb de presión (Mannai *et al.*, 2018). Las semillas fueron sembradas mediante un procedimiento mecánico estandarizado; el sustrato húmedo se depositó a tres cuartas partes de la capacidad total de la cavidad, se colocó una semilla por cavidad a una profundidad de 1 cm (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). Se utilizó Mancozeb 80[®] como tratamiento químico, donde se siguió las recomendaciones del productor para la producción de plántula (1 kg de semilla por 5 g de producto), además se utilizó un tratamiento control; el cual consistió en semillas desinfectadas en una solución estéril de agua destilada y sacarosa al 3%, sin presencia de actividad fúngica. Por último, se cubrieron las charolas con plástico negro por 10 días, y se mantuvo

treatment under study; once the pathogen was soaked and the seeds were dry, *T. harzianum* and *T. koningiopsis* were inoculated. This was carried out with a suspension of teliospores at a concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1} for two separate treatments, each one with 400 seeds (Reyes-Tena *et al.*, 2019). Once the seeds were inoculated with the fungi, the seeds were placed in germinating trays with Peatmoss and Agrolita (1:1 v/v) after sterilizing it at 121°C and 15 lb of pressure (Mannai *et al.*, 2018). The seeds were planted using a standard mechanical procedure; the humid substrate was placed to take up three quarters of the total cavity, and one seed was placed in each cavity at a depth of 1 cm (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). Mancozeb 80[®] was used as a chemical treatment, following the manufacturer's recommendations for the production of the seedling (1 kg of seed for every 5 g of product), along with the use of a control treatment, which consisted of seeds that were disinfested in a solution of sterile distilled water and sucrose at 3%, without fungal activity. Finally, the trays were wrapped with black plastic for 10 days and the temperature was kept between 10 and 27°C during germination (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). The percentages of seed germination were calculated using the following formula: seed germination (%) = (number of germinated seeds/total number of seeds) \times 100 (Al-Fadhil *et al.*, 2019). The data were taken when the control treatment presented a germination rate of $\geq 90\%$.

Mortality and rate of severity in plants 40 dat. We used 1,500 Miahuateco chili seedlings 15 days after emergence, provided by local farmers. The trial was conducted under open field conditions in the town of Santa María Tecomavaca, between parallels $17^\circ 51'$ and $18^\circ 03'$ latitude N, and meridians $96^\circ 57'$ and $97^\circ 15'$ longitude W, at an altitude between 400 and 2600 masl. The predominant climates in the area are dry warm (40.5%) and semidry warm

la temperatura entre 10 y 27 °C para la germinación (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015). Los porcentajes de germinación de semillas se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: Germinación de semillas (%) = (número de semillas germinadas/número total de semillas) × 100 (Al-Fadhil *et al.*, 2019). Los datos se tomaron en el momento que el tratamiento control presentó una germinación ≥ 90%.

Mortalidad e índice de severidad en plantas de 40 ddt. Se utilizaron 1,500 plántulas de chile Mihuato de 15 días de emergencia proporcionadas por productores de la comunidad. El ensayo se llevó bajo condiciones a campo abierto en la comunidad de Santa María Tecomavaca, entre los paralelos 17° 51' y 18° 03' de latitud norte; los meridianos 96° 57' y 97° 15' de longitud oeste con una altitud entre 400 y 2 600 m. Los climas predominantes en la zona son seco cálido (40.5%) y semiseco cálido (17.5%) (INEGI, 2017). La preparación del terreno se realizó por productores de la comunidad tres meses antes del establecimiento del cultivo. Se llevó a cabo una labor de arado de 50 cm de profundidad para disminuir la compactación y favorecer el drenaje y dos volteos de 30 cm de profundidad para airear el suelo. La fecha de trasplante fue el 27 de marzo de 2018 a una profundidad de 3 cm. Se fertilizó con 90-80-80 de N, P y K a los 15 días (ddt). El diseño experimental fue bloques al azar con tres repeticiones, la densidad de población fue de seis plantas por m². Durante el desarrollo del cultivo se realizaron riegos con intervalos de cinco a seis días, aplicados antes que la humedad del suelo alcanzara el 50% de la capacidad de campo (Vázquez-Casarrubias *et al.*, 2011).

La inoculación de *F. solani* (MX-MIC 798) se realizó al cuello de cada una de las plantas de chile (100 plántulas por tratamiento distribuidas en cinco bloques al azar) con 1 mL de solución a una concentración de 1x10⁸ conidios. Después de 36 h se

(17.5%) (INEGI, 2017). The ground was prepared by local farmers three months before planting. The field was plowed to a depth of 50 cm in order to reduce compaction and favor draining, along with two harrows-turns to a depth of 30 cm to ventilate the soil. The transplanting date was March 27, 2018, at a depth of 3 cm. Fertilization was carried out with 90-80-80 of N, P and K after 15 days (dat). The experimental design was random block with three repetitions and the population density was six plants per m². During the development of the crop, the field was irrigated every five to six days, before the soil humidity reached 50% of the capacity of the field (Vázquez-Casarrubias *et al.*, 2011).

F. solani (MX-MIC 798) was inoculated at the neck of each chili plant (100 seedlings per treatment distributed into five random blocks) with 1 mL of solution at a concentration of 1x10⁸ conidia. After 36 h, the plants were inoculated with strains of *Trichoderma* (T-H4 and T-K11) at the same concentration as the pathogen (1x10⁸ conidia mL⁻¹), for each strain, applied to the root for all treatments. For the chemical treatment, Mancozeb 80[®] was applied on the third day, following the recommendations provided by the manufacturer (480 g 200 L⁻¹ of water per ha). The control treatment was only given sterile water with no fungal activity. The plants were kept on the field for 40 days. The severity of the disease was calculated in the infected section in relation with the total root length (Perveen *et al.*, 2010) and classified on the scale of 0 to 3, where 0 = 0 to 25% of severity, 1 = 26 to 50%, 2 = 51 to 75% and 3 = 76 to 100% (Bokhari and Perveen, 2013).

Finally, after week 6 in the field, reisolation was carried out. Small symptomatic root sections were taken (approx. 1 × 1 cm), sterilized with sodium hypochlorite at 1% for 30 s and rinsed three times with sterile distilled water. The segments were then placed in a PDA medium and incubated in the dark

procedió a inocular las plantas con cepas de *Trichoderma* (T-H4 y T-K11) a una misma concentración que del patógeno (1×10^8 conidios mL^{-1}), por cada cepa, aplicado a la raíz para todos los tratamientos. Para el tratamiento químico, se aplicó Mancozeb 80® al tercer día, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (480 g 200 L^{-1} de agua por ha). El tratamiento control únicamente se aplicó agua estéril sin presencia de actividad fúngica. Las plantas se mantuvieron durante 40 días en campo. La severidad de la enfermedad se calculó en la porción infectada en relación con la longitud total de las raíces (Perveen *et al.*, 2010) y clasificada en la escala de 0 a 3 donde, 0 = 0 a 25% de severidad, 1 = 26 a 50%, 2 = 51 a 75% y 3 = 76 a 100% (Bokhari y Perveen, 2013).

Finalmente, se realizó el re-aislamiento a la sexta semana en campo. Se tomaron secciones pequeñas (aprox. $1 \times 1 \text{ cm}$) de raíz con síntomas de enfermedad, se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 s y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, los segmentos fueron colocados en medio PDA, se incubaron bajo oscuridad a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 días. Las colonias desarrolladas fueron purificadas por cultivos monospóricos o punta de hifa y se identificaron las estructuras con claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) en un sistema de micro cultivo con un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones (Samson *et al.*, 2014) y se conservaron en una solución de glicerol al 20% a $-84 \text{ }^\circ\text{C}$ (Morales *et al.*, 2020).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron con ANOVA (dos vías) en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25. La velocidad de crecimiento y la tasa de desarrollo fueron las variables de respuestas con tres repeticiones y se validó por duplicado en un diseño estadístico completamente al azar. Se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con un nivel de

at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 days. The cultures that developed were purified with monosporic or hyphae tips and the structures were identified using taxonomic keys by Barnett and Hunter (1998) in a microculture system using an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 1000x (Samson *et al.*, 2014), and were stored in a 20% glycerol solution at $-84 \text{ }^\circ\text{C}$ (Morales *et al.*, 2020).

Statistical analysis. The data were analyzed with an ANOVA (two-ways) in the IBM SPSS Statistics statistical package, version 25. Growth speed and development rate were the response variables with three repetitions and they were validated in duplicate in a totally random statistical design. Means were compared with the method by Tukey-Kramer with a level of probability of $p \leq 0.05$. PICR, the percentage of germination, mortality (%) and the severity of the disease were expressed as percentages and transformed with an angular arccosine $\sqrt{x+1}$. They then underwent an analysis of variance (two-way), along with the variables of total height, root height and rootless plant; the Tukey-Kramer test was used to determine the significant differences between treatments with a significance of $p \leq 0.05$. In turn, the PICR was compared based on Student's *t* test for paired samples ($p \leq 0.05$) using the same statistical package.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of the antagonism of *T. harzianum* and *T. koningiopsis* against *F. solani* in dual cultures. Areas of interaction appeared between *T. harzianum* (TH-4) and *T. koningiopsis* (T-K11) against *F. solani* (MX-MIC 798), where parasitism was observed after 132 h. The rate of development and speed of growth presented significant differences ($p \leq 0.05$), where *T. harzianum* obtained the highest value (Table 2) with 0.972 ± 0.008

probabilidad de $p \leq 0.05$. El PICR, el porcentaje de germinación, la mortalidad (%) y la severidad de enfermedad fueron expresados en porcentajes y transformados con arco-coseno angular $\sqrt{x+1}$. Posteriormente, se sometieron a un análisis de varianza (dos vías), al igual que las variables altura total, altura raíz y altura planta sin raíz; se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos con una significancia de $p \leq 0.05$. Así mismo, el PICR se compararon en base a la prueba t de student para muestras apareadas ($p \leq 0.05$) utilizando el mismo paquete estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del antagonismo de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* ante *F. solani* en cultivo dual. Se presentaron zonas de interacción entre *T. harzianum* (TH-4) y *T. koningiopsis* (T-K11) frente a *F. solani* (MX-MIC 798), donde se observó un parasitismo a las 132 h. La tasa de desarrollo y la velocidad de crecimiento tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), donde *T. harzianum* obtuvo el valor más alto (Cuadro 2) con 0.972 ± 0.008 mm h⁻¹ y

mm h⁻¹ and 1.3238 ± 0.0024 cm d⁻¹, respectively. Morales *et al.* (2020) reported a higher speed of growth than in the present study for strain TH-4 with 1.86 ± 0.22 cm d⁻¹ and 1.67 ± 0.01 mm h⁻¹ for the development rate. *F. solani* presented the lowest speed of growth (0.4718 ± 0.00063 cm d⁻¹). A study carried out by Andrade-Hoyos *et al.* (2019) reaffirm the results obtained in the present investigation, in which different species of *Trichoderma* spp. have superiorities over the mycelial growth of *F. oxysporum* (0.22 mm). The reduction in the growth rate of dual cultures is an indicator of the antagonistic ability of *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). The percentage of inhibition of radial growth (PICR) of *F. solani* exerted by *T. koningiopsis* and *T. harzianum* presents significant differences ($p < 0.0001$) from day eight (Table 2), when the strain T-H4 was 1.33% higher than *T. koningiopsis* T-K11 and a class II classification (Figure 1 A and B), according to the scale established by Bell *et al.* (1982).

The present investigation coincides with Sundaramoorthy and Balabaskar (2013), who found an inhibition of 53% in the mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Likewise, Jagraj *et al.* (2018) reported a PICR of 55.6% for

Cuadro 2. Tasa de desarrollo, velocidad de crecimiento, porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Trichoderma* y *F. solani* bajo condiciones *In vitro*.

Table 2. Rate of development, growth speed, percentage of inhibition of radial growth of *Trichoderma* and *F. solani* under *in vitro* conditions.

Nombre	Tasa de desarrollo (mm h ⁻¹) ^y	Velocidad de crecimiento (cm d ⁻¹) ^y	PICR ^z	Clase Antagonismo
<i>T. harzianum</i>	0.972 ± 0.08^a	1.3238 ± 0.024^a		
<i>T. koningiopsis</i>	0.912 ± 0.012^b	1.2369 ± 0.063^b		
<i>F. solani</i>	0.391 ± 0.019^c	0.4718 ± 0.006^c		
<i>F. solani</i> vs. <i>T. harzianum</i>			53.33 ± 0.20^a	II
<i>F. solani</i> vs. <i>T. koningiopsis</i>			52 ± 0.002^b	III

^yLetras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. ^zMedias con letras diferentes, indican diferencias significativas con la prueba de t de student ($p \leq 0.05$). / ^zDifferent letters mean significant difference between treatments according to Tukey-Kramer for $p \leq 0.05$. ^zMeans with different letters indicate significant differences with Student's t test ($p \leq 0.05$).

1.3238±0.0024 cm d⁻¹, respectivamente. Morales *et al.* (2020) presentaron una velocidad de crecimiento mayor que en el presente estudio para la cepa TH-4 con 1.86± 0.22 cm d⁻¹ y 1.67 ± 0.01 mm h⁻¹ para la tasa de desarrollo. *F. solani* presentó la menor velocidad de crecimiento (0.4718±0.00063 cm d⁻¹). Un estudio realizado por Andrade-Hoyos *et al.* (2019) reafirman los resultados obtenidos en la presente investigación, donde diferentes especies de *Trichoderma* spp., poseen superioridades sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (0.22 mm). La reducción en la tasa de crecimiento en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagonista de *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *F. solani* ejercido por *T. koningiopsis* y *T. harzianum* presenta diferencias significativas ($p < 0.0001$) a partir del día ocho (Cuadro 2), donde la cepa T-H4 presentó 1.33% mayor a *T. koningiopsis* T-K11 y una clasificación clase II (Figura 1 A y B) de acuerdo con la escala que estableció Bell *et al.* (1982).

La presente investigación coincide con Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), donde encontraron una inhibición del 53% de crecimiento micelial de

F. oxysporum against *T. koningiopsis*, for strains isolated from tomato plants. Michel-Aceves *et al.* (2019) obtained a class II antagonism on *F. oxysporum* with *T. harzianum*, which were similar results to those obtained in this investigation.

Suárez *et al.* (2008) presented 12 isolations of *T. harzianum* confronted with *F. solani*, where they obtained a PICR between 60 and 70% of the antagonism. Nagendran *et al.* (2016) reported that 15 isolations of *Trichoderma* spp. reached an inhibition of over 50% on the mycelial growth of *F. solani*, in which strain Phyto-4 obtained the highest inhibition (66.1%). Likewise, Sánchez-García *et al.* (2017) reported a PICR of 59.1% for *F. solani* against *T. harzianum* (Tri-4), which are higher results than those obtained in the present investigation. This indicates that *T. harzianum* may have a higher rate of incorporation of nutrients and a higher metabolism than *F. solani*, as well as different mechanisms for the secretion of hydrolytic enzymes, including cellulases, chitinases, glucanases, xylases and proteases, which may be involved in biocontrol mechanisms, helping it make better use of nutrients from the medium and deprive the pathogen of the resources

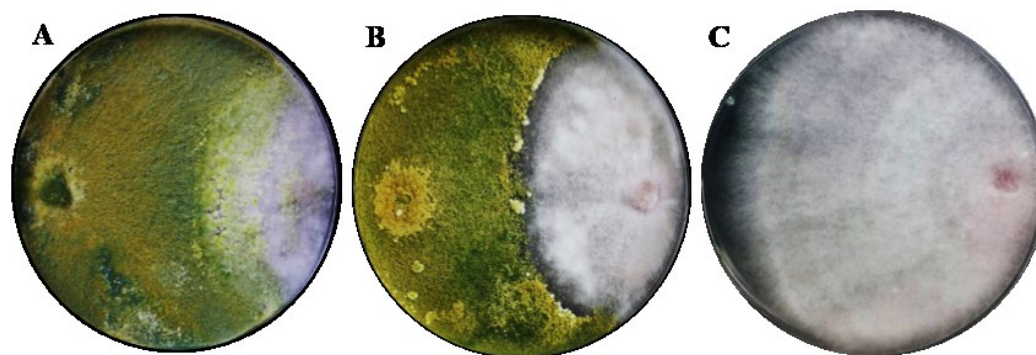


Figura 1. Antagonismo de *Trichoderma* con *F. solani* en escala de Bell *et al.* (1982), a las 132 h en cajas con medio PDA, incubados a 28 °C por 10 días, (A) antagonismo clase II de *T. harzianum* (T-H4) y *F. solani* (MX-MIC 798), (B) antagonismo clase III de *T. koningiopsis* (T-K11) y *F. solani* (C) *F. solani* sin interacción.

Figure 1. Antagonism of *Trichoderma* with *F. solani* on the scale by Bell *et al.* (1982) after 132 h in dishes with PDA medium, incubated at 28 °C for 10 days, (A) class II antagonism of *T. harzianum* (T-H4) and *F. solani* (MX-MIC 798), (B) class III antagonism of *T. koningiopsis* (T-K11) and *F. solani* (C) *F. solani* without interaction.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici*. Asimismo, Jagraj *et al.* (2018) reportan un PICR de 55.6% para *F. oxysporum* frente a *T. koningiopsis*, para cepas aisladas de plantas de jitomate. Michel-Aceves *et al.* (2019) obtuvieron un antagonismo clase II sobre *F. oxysporum* con *T. harzianum*, que fueron resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

Suárez *et al.* (2008) presentaron 12 aislamientos de *T. harzianum* confrontados para *F. solani*, donde obtuvieron un PICR entre el 60 y 70% del antagonismo. Nagendran *et al.* (2016) reportaron que 15 aislados de *Trichoderma* spp., alcanzaron más del 50% de inhibición sobre el crecimiento micelial de *F. solani*; donde la cepa Phyto-4 obtuvo la mayor inhibición (66.1%). De igual manera, Sánchez-García *et al.* (2017) reportan un PICR de 59.1% para *F. solani* frente a *T. harzianum* (Tri-4), resultados superiores a los obtenidos en el presente trabajo. Esto indica que probablemente, *T. harzianum* puede tener una tasa de incorporación de nutrientes y un metabolismo superior a *F. solani*, así como distintos mecanismos de secreción de enzimas hidrolíticas; entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xylasas y proteasas, las cuales pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiéndole aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos (Michel-Aceves *et al.*, 2005). Además *T. harzianum* es capaz de inhibir del crecimiento de fitopatógenos porque produce numerosos antibióticos como tricodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, penicilina, tricotecenos, tricorzianinas, entre otros (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020).

El micoparasitismo es otro mecanismo de acción que presenta el género *Trichoderma*. En esta investigación, se logró observar granulación de la cepa MX-MIC 798 inducida por *T. harzianum*, así como ruptura de septos y estrangulación (Figura 2). Esto resalta la eminente capacidad micoparasítica de

(Michel-Aceves *et al.*, 2005). *T. harzianum* is also capable of inhibiting the growth of phytopathogens, since it produces numerous antibiotics, such as trichodermine, suzukacillin, alameticin, dermadin, penicillin, trichothecenes, trichorzianines and others (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020).

Mycoparasitism is another action mechanism displayed by the genus *Trichoderma*. In this investigation, we found granulation from the strain MX-MIC 798 induced by *T. harzianum*, as well as the breaking of septa and strangulation (Figure 2). This highlights the eminent micoparasitic ability of strain TH-4. Duarte-Leal *et al.* (2017) found micoparasitism between hyphae in *T. asperellum* (Ta.25), in which they observed lysis in hyphae of *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50), as reported in the present investigation. Other studies, carried out by Hyder *et al.* (2017), refers to the enzyme degradation of the cell wall of phytopathogenic fungi during the micoparasitic action, which causes lysis and thus the disorganization of the cytoplasmic content. For *T. koningiopsis*, this investigation was unable to observe the micoparasitic mechanism or breaking of the septae.

The growth rate and antagonism tests are tools to predict and determine the biocontrolling ability. According to Morales *et al.* (2020), these studies help select efficient antagonistic strains for evaluation under field conditions and obtain the best results.

Percentage of germination and rot caused by *F. solani* in Miahuateco chili seedlings in the nursery. The germination of the seeds from the control treatment was displayed after 12 days with 91% and significant differences ($p=0.0023$) in regard to the remaining treatments (Table 3), in which the effect of the inoculation from *F. solani* (MX-MIC 798), which affected the neck of the root, causing rot and death of the plant, as well

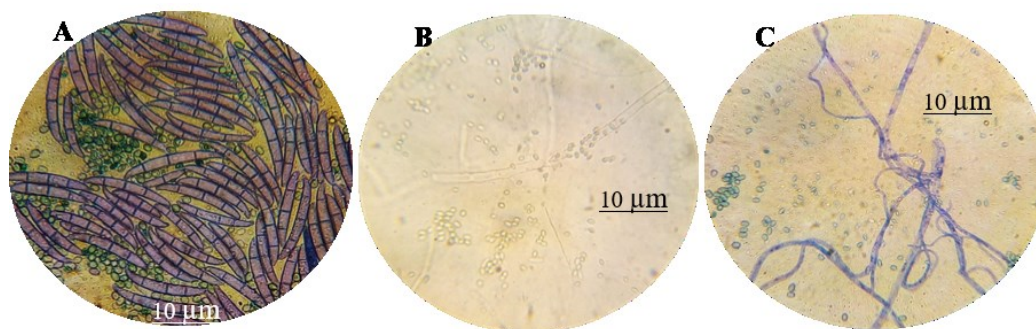


Figura 2. Micoparasitismo de *T. harzianum* (T-H4) sobre *F. solani* (MX-MIC 798) en medio PDA, incubados a 28 °C por 10 días; A) interacción de conidios de *T. harzianum* vs. macroconidios septados de *F. solani*; B) granulación y ruptura de septos de la cepa MX-MIC 798 inducida por *T. harzianum*; C) estrangulamiento de hifas de *F. solani* por la cepa TH-4.

Figure 2. Mycoparasitism of *T. harzianum* (T-H4) on *F. solani* (MX-MIC 798) in PDA medium, incubated at 28 °C for 10 days; A) interaction of *T. harzianum* conidia vs. *F. solani* septated macroconidia; B) granulation and breaking of septa of the strain MX-MIC 798 induced by *T. harzianum*; C) strangling of *F. solani* hyphae by strain TH-4.

la cepa TH-4. Duarte-Leal *et al.* (2017) observaron micoparasitismo entre hifas de *T. asperellum* (Ta.25) donde se observó lisis en hifas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50), como lo reportado en la presente investigación. Otros estudios realizados por Hyder *et al.* (2017), hacen referencia sobre la degradación enzimática de la pared celular de los hongos fitopatógenicos durante la acción micoparasítica, que causa lisis y con ello la desorganización del contenido citoplasmático. En el presente trabajo, para *T. koningiopsis*, no se logró observar el mecanismo de micoparasitismo ni ruptura de septos.

La tasa de crecimiento y las pruebas de antagonismo son herramientas para predecir y determinar la capacidad biocontroladora. De acuerdo con Morales *et al.* (2020) estos estudios permiten la selección de cepas antagonicas eficientes para ser evaluadas en condiciones de campo y obtener mejores resultados.

Porcentaje de germinación y podredumbre causada por *F. solani* en plántulas de chile

as the lowest percentage of germination (30%). In this investigation, the Miahuateco chili seeds inoculated with strain MX-MIC 798 treated with *T. harzianum* T-H4 showed a germination rate of 82%, even higher than the value reported by Ezziyyani *et al.* (2004), who obtained a percentage of germination of 60% in bell pepper seeds treated with *T. harzianum* after 10 days. In untreated plants inoculated with *F. solani*, root rot reached level 4.0 and a mortality of 70% (Table 3) in the scale proposed by Ezziyyani *et al.* (2004). Madhavi *et al.* (2006) reported a percentage of germination of 90.3% in chili seedlings (*C. annuum*) inoculated with *T. harzianum-m1* and *F. solani* under nursery conditions, similar results to those found in the present investigation.

The microbial antagonists reduced rot caused by *F. solani* under nursery conditions in Miahuateco chili seeds significantly (22%), whereas *T. harzianum* presented the lowest percentage of plant mortality (18%), higher than strain T-K11, which obtained 26%. The group treated with Mancozeb 80® reduced seed mortality by 28% and presented

Miahuateco en vivero. La germinación de semillas del tratamiento control se presentó a los 12 días en 91%, con diferencias significativas ($p= 0.0023$) respecto a los tratamientos restantes (Cuadro 3), donde se observó el efecto de la inoculación de *F. solani* (MX-MIC 798), que afectó el cuello de la raíz al provocar podredumbre y muerte de la planta, así como el porcentaje de germinación más bajo (30%). En esta investigación, las semillas de chile Miahuateco inoculadas con la cepa MX-MIC 798 tratadas con *T. harzianum* T-H4 mostraron 82% de germinación; un valor aún más alto que lo reportado por Ezziyyani *et al.* (2004) donde obtuvieron un porcentaje de germinación del 60% en semillas de pimiento tratadas con *T. harzianum* a los 10 días. En las plantas no tratadas e inoculadas con *F. solani*, la podredumbre de la raíz alcanzó el nivel 4.0 y una mortalidad de 70% (Cuadro 3) en la escala propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004). Madhavi *et al.* (2006) reportaron un porcentaje de germinación del 90.3% en plántulas de chile (*C. annuum*) inoculadas con *T. harzianum*-m1 y *F. solani* en invernadero, resultados similares a los encontrados en la presente investigación.

no significant differences with *T. koningiopsis*; the control treatment accounted for a feasibility of 91% in seed germination (Table 3).

The Mancozeb 80® chemical treatment presented high mortality results, which could indicate the creation of resistance by *F. solani* to this fungicide. Some fungicides used, such as triazoles, tend to develop resistance to the fungal populations due to genic factors (accumulative with time), since they only have one place of action (Leroux and Walker, 2011; Ziogas and Malandrakis, 2015). Chen *et al.* (2014) reported that *Fusarium fujikuroi* uses a resistance mechanism generated by the mutation of $\beta 2$ tub by the fungicide carbendazim, making its management difficult, although it opens the possibility of generating new control measures with antagonistic agents.

Mortality and rate of severity in plants 40 dat. The Miahuateco variety chili seedlings that were inoculated with *F. solani* at the moment of transplanting displayed rot in the roots 40 days after inoculation. Long reddish lesions were found, which covered 10% of the total surface of the main

Cuadro 3. Efecto de la actividad antagónica de *T. harzianum* y *T. koningiopsis* sobre la germinación y podredumbre causada por *F. solani* en semillas de chile Miahuateco, bajo condiciones de vivero.

Table 3. Effect of the antagonistic activity of *T. harzianum* and *T. koningiopsis* on the germination and rot caused by *F. solani* in Miahuateco chili seeds, under nursery conditions.

Tratamientos	Germinación (%) ^y	Severidad ^z	Podredumbre causada por <i>F. solani</i> (%)
<i>F. solani</i> (MX-MIC 798)	30 ^d	4	80
<i>F. solani</i> vs. <i>T. harzianum</i> (T-H4)	82 ^b	1	25
<i>F. solani</i> vs. <i>T. koningiopsis</i> (T-K11)	74 ^c	2	30
<i>F. solani</i> vs. Mancozeb 80®	72 ^c	2	30
Tratamiento control	91 ^a	0	0

^yEvaluación realizada en la escala graduada de 0 (ningún síntoma) a 5 (planta muerta) propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004). ^yLetras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. / ^zEvaluation performed on the gradual scale of 0 (no symptoms) to 5 (dead plant) proposed by Ezziyyani *et al.* (2004). ^zDifferent letters mean significant differences between treatments according to Tukey-Kramer for $p \leq 0.05$.

Los antagonistas microbianos redujeron significativamente (22%) la podredumbre de semillas en chile Miahuateco causada por *F. solani* en vivero, *T. harzianum* presentó el porcentaje más bajo de mortalidad en plántulas (18%), superior a la cepa T-K11, que obtuvo 26%. El grupo tratado por Mancozeb 80® redujo la mortalidad de semillas en un 28% y no presentó diferencias significativas con *T. koningiopsis*; el tratamiento control representó el 91% de viabilidad en la germinación de semillas (Cuadro 3).

El tratamiento químico Mancozeb 80® presentó resultados altos de mortalidad, lo que puede indicar generación de resistencia por parte de *F. solani* ante este fungicida. Algunos fungicidas utilizados como los triazoles, tienden a desarrollar resistencia a la población de hongos por factores genéticos (acumulable con el tiempo) ya que poseen un sólo sitio de acción (Leroux y Walker, 2011; Ziogas y Malandrakis, 2015). Chen *et al.* (2014) reportaron que *Fusarium fujikuroi* utiliza un mecanismo de resistencia generado por la mutación de la β 2tub ante el fungicida carbendazim, lo que dificulta su manejo, sin embargo, abre la posibilidad de generar nuevas medidas de control con agentes antagonistas.

Mortalidad e índice de severidad en plantas de 40 ddt. Las plántulas de chile variedad Miahuateco que fueron inoculadas con *F. solani* al momento del trasplante, presentaron pudriciones en la raíz a los 40 días después de la inoculación; se observaron lesiones alargadas de color rojizo que cubrían 10% de la superficie total de la raíz principal, además, se pudo apreciar manchas café-rojizas en la porción del tallo que se encuentra por debajo del suelo y una pérdida considerable de raíces laterales, esto coincidió con lo descrito por Agrios (2006).

Los resultados de campo mostraron que los tratamientos con actividad antifúngica fueron efectivos para reducir entre el 48 y 51% de mortalidad por marchitez y pudrición de la raíz en plantas de chile

root and reddish-brown spots were also observed in the section of the stem found under the soil surface, along with a considerable loss of lateral roots. This coincided with descriptions by Agrios (2006).

The field results showed that the treatments with antifungal activity were effective to reduce mortality by wilting and root rot in Miahuateco chili plants under induced infection by 48 and 51% respectively, and it reduced the severity of the disease 40 dat by 50% (Table 4). Strain T-H4 presented the lowest percentage of plant mortality (48%), yet it displayed no significant differences with the Mancozeb 80® fungicide, which accounted for 47% of the mortality. Similarly, Thangavelu *et al.* (2004) showed that *T. harzianum* (Th-10) efficiently controlled the fusarial wilting of the banana tree, comparable to chemical control. Nagendran (2016), found the highest percentage (36.9%) of the reduction of the disease with strain Phyto-6, and also displayed a lower severity in wilting, as shown by the present investigation. *T. koningiopsis* T-K11 obtained a mortality of 51%, presenting significant differences with the control group (23%), which obtained the lowest mortality.

During their development, the plants infected by *F. solani* presented symptoms of yellowing in the basal part, yellowing of the nervations in 30% of leaves, as described by Black *et al.* (1993) in chili plants (*C. annuum*) that survived the infection on the field. The analysis of variance for the total plant height displayed highly significant differences ($p= 0.0002$) between treatments. Mancozeb 80® obtained the greatest height (25.6±2.78 cm), followed by plants inoculated with *T. harzianum* (24±1.98 cm) and *T. koningiopsis* (21±1.81 cm). The lowest height appeared recurrently in plants inoculated with *F. solani* with 16±0.28 cm, as shown in Figure 3A. Agrios (2006) mentions that plants affected by *Fusarium* sp. reduce their growth, due to the ability of the pathogen to colonize roots, preventing the adequate nutrition of the plant.

Miahuateco bajo infección inducida y, disminuyó 50% la severidad de la enfermedad a los 40 ddt (Cuadro 4). La cepa T-H4 presentó el porcentaje más bajo de mortalidad (48%) de plantas; sin embargo, no presentó diferencias significativas con el fungicida Mancozeb 80®, que representó el 47% de mortalidad. De manera similar, Thangavelu *et al.* (2004) mostraron que *T. harzianum* (Th-10) controló eficazmente el marchitamiento fusarial del banano, comparable al control químico. Nagendran (2016), encontró el porcentaje máximo (36.9%) de reducción de la enfermedad con la cepa Phyto-6, además mostró una menor severidad en la marchitez, como se observó en la presente investigación. *T. koningiopsis* T-K11 obtuvo el 51% de mortalidad, presentando diferencias significativas con el grupo control (23%), que obtuvo la mortalidad más baja.

Durante el desarrollo de las plantas infectadas por *F. solani*, presentaron síntomas de amarillamiento en la parte basal, aclaramiento de nervaduras en un 30% de las hojas, como lo describieron Black *et al.* (1993) en plantas de chile (*C. annuum*) que sobrevivieron a la infección en campo. El análisis de varianza de altura total de la planta presentó

The genus *Trichoderma* can parasitize pathogenic fungi and produce antibiotics. It also presents positive effects in plant growth, yield, absorption of nutrients, fertilizer use efficiency and the systemic resistance of plants to diseases (Hyder *et al.*, 2017; Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). In a study carried out by Cole and Zvenyika (1988), they noticed that the infection caused by *F. solani* in tobacco plants could be controlled when applying *T. harzianum* in disease management procedures. Likewise in a study by Yedidia *et al.* (1999), when inoculating *T. harzianum* in early growth, where the absorption of nutrients in the plant improved. These investigations agree with studies by Tsegaye-Redda *et al.* (2018), who mention that *Trichoderma* sp. has the ability to antagonize the phytopathogens present in the soil, and also induces the promotion of plant growth and protects plants from biotic and abiotic stress. The studies by Dubey *et al.* (2007) have been confirmed in *T. harzianum*, where seed germination, root health and sprout length have improved and the frequency of healthy plants has increased, as confirmed by the present investigation.

Forty dat with the strain MX-MIC 798 that led to the development of necrotic lesions in the roots

Cuadro 4. Actividad antagonista de *Trichoderma* sobre el porcentaje de mortalidad a los 40 ddt y severidad de la enfermedad inducida por *F. solani* en cultivo de chile Miahuateco.

Table 4. Antagonistic activity of *Trichoderma* on the percentage of mortality 40 dat and severity of the disease induced by *F. solani* in Miahuateco chili crop.

Tratamientos	Mortalidad (%) ^z	Severidad de la enfermedad	Tamaño de planta sin raíz (cm) ^z	Tamaño de raíz (cm) ^z	Altura total (cm) ^z
<i>F. solani</i> (MX-MIC 798)	86±1.34 ^a	3 - 76%	12±1.12 ^c	1.3±0.12 ^c	16±0.28 ^c
<i>F. solani</i> vs. <i>T. harzianum</i> (T-H4)	48±1.16 ^c	1 - 25%	18±1.97 ^a	2.1±0.09 ^b	24±1.98 ^a
<i>F. solani</i> vs. <i>T. koningiopsis</i> (T-K11)	51±1.31 ^b	2 - 51%	17±2.62 ^{ab}	1.9±0.30 ^b	21±1.81 ^a
<i>F. solani</i> vs. Tratamiento químico (Mancozeb 80®)	47±1.36 ^c	1 - 25%	21±2.15 ^a	2.6±0.26 ^a	25.6±2.78 ^a
Grupo control	23±0.38 ^d	0 - 0%	16±0.02 ^b	1.6±0.18 ^b	18.4±1.08 ^b

Evaluación realizada en la escala graduada de 0 a 3 donde, 0 = 0 a 25% de severidad, 1 = 26 a 50%, 2 = 51 a 75% y 3 = 76 a 100% propuesta por Bokhari y Perveen, 2013. ^zLetras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. / Evaluation performed on the gradual scale of 0 to 3, where 0 = 0 to 25% of severity, 1 = 26 to 50%, 2 = 51 to 75% and 3 = 76 to 100% proposed by Bokhari and Perveen, 2013. ^zDifferent letters mean a significant difference between treatments according to Tukey-Kramer for $p \leq 0.05$.

diferencias altamente significativas ($p= 0.0002$) entre los tratamientos. Mancozeb 80® obtuvo la mayor altura (25.6 ± 2.78 cm), seguido por las plantas inoculadas por *T. harzianum* (24 ± 1.98 cm) y *T. koningiopsis* (21 ± 1.81 cm), de manera recurrente, la menor altura se presentó en plantas inoculadas con *F. solani* con 16 ± 0.28 cm, como se muestra en la Figura 3A. Agrios (2006), menciona que las plantas afectadas por *Fusarium* sp., reducen su crecimiento debido a la capacidad del patógeno de colonizar raíces, lo que impide una adecuada nutrición de la planta.

El género *Trichoderma* puede parasitar hongos patógenos y producir antibióticos. Además, presenta efectos positivos en el crecimiento de las plantas, el rendimiento, la absorción de nutrientes,

and stems of evaluated plants, we proceeded to re-isolate in order to satisfy Koch's postulates. The fungal cultures developed abundant aerial mycelia, with a cotton-like texture and white in color with purple tones (Figure 3B), which appeared more intense in the middle of the culture medium (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). The duration of the microculture until chlamydospores were visible was 14 days; for macroconidia, seven days; and for phialides and microconidia, four days. Oval-shaped septated mycelia and abundant microconidia were observed, with an average size of $2.4 \times 6.3 \mu\text{m}$ in length by $2 \times 4 \mu\text{m}$ in width (Figure 3C), along with the typically crescent-moon shaped macroconidia, one to four septa (Figure 3F), an average size of $2.4 \times 4.1 \mu\text{m}$ in width and $11.8 \times 36.4 \mu\text{m}$ long (Barnett



Figura 3. Estructuras de reproducción de *F. solani* (MX-MIC 798) de 10 días en medio PDA a 28 °C. A) planta muerta de *Capsicum annuum* variedad Miahuateco inoculada con *F. solani* MX-MIC 798, B) colonia de *F. solani* en medio PDA; C) microconidios de *F. solani*; D) fiálides y microconidios en falsas cabezas de *F. solani*; E) clamidosporas de *F. solani*; F) micro y macroconidios de *F. solani*.

Figure 3. Reproduction structures of *F. solani* (MX-MIC 798) after 10 days in a PDA medium at 28 °C. A) dead *Capsicum annuum* var Miahuateco plant inoculated with *F. solani* MX-MIC 798, B) *F. solani* culture in PDA medium; C) microconidia of *F. solani*; D) phialides and microconidia in false *F. solani* heads; E) *F. solani* chlamydospores; F) *F. solani* micro and macroconidia.

la eficiencia en la utilización de fertilizantes y la resistencia sistémica a las enfermedades de las plantas (Hyder *et al.*, 2017; Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Cole y Zvenyika (1988), observaron que la infección causada por *F. solani* en plantas de tabaco, podría controlarse al aplicar *T. harzianum* en los procedimientos de manejo de enfermedades. Así como se demostró por un estudio realizado por Yedidia *et al.* (1999) al inocular *T. harzianum* en el crecimiento temprano, donde mejoró la absorción de nutrientes por la planta. Estos trabajos concuerdan con los estudios de Tsegaye-Redda *et al.* (2018) quienes mencionan que *Trichoderma* sp., tiene la capacidad de antagonizar a los fitopatógenos presentes en el suelo, así como también induce la promoción del crecimiento de las plantas y protege a las plantas del estrés biótico y abiótico. Los estudios de Dubey *et al.* (2007) han sido confirmados en el caso de *T. harzianum*, donde ha mejorado la germinación de las semillas, la sanidad de las raíces y la longitud de los brotes, además de aumentar la frecuencia de plantas sanas, como lo confirmado en la presente investigación.

Transcurridos 40 ddt con la cepa MX-MIC 798 y que indujo desarrollo de lesiones necróticas en raíces y tallos de las plantas evaluadas, se procedió al re-aislamiento con el fin de cumplir con los postulados de Koch. Las colonias fúngicas desarrollaron micelio aéreo abundante, de textura algodonosa y de color blanco con tonalidad púrpura (Figura 3B), más intenso en el centro del medio de cultivo (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). La duración del micro-cultivo para observar las clamidosporas fue de 14 días, de macroconidias siete días, así como de fiálides y microconidias con cuatro días. Se logró observar micelio septado y abundantes microconidias en forma ovoide de tamaño promedio de 2.4 x 6.3 µm de largo por 2 x 4 µm de ancho (Figura 3C), además de macroconidias con la típica forma de hoz o de luna, de uno a cuatro septos (Figura

and Hunter, 1998). Likewise, chlamidospores were also observed (Figure 3E), 8.4-10.5 µm in diameter and with particular morphometric characteristics reported by Montealegre *et al.* (2003).

CONCLUSIONS

The strains *T. harzianum* (TH-4) and *T. koningiopsis* (T-K11) displayed classes II and III of antagonism, respectively, on *F. solani* on the Bell scale. In addition *T. harzianum* TH-4 displayed the highest rate of development, speed of growth and percentage of inhibition of PICR radial growth on *F. solani* MX-MIC 798 (53%) under *in vitro* conditions.

In nursery conditions, *T. harzianum* TH-4 (82%) and *T. koningiopsis* T-K11 (74%) presented the best response in the germination of Miahuatenco variety chili plants, with the highest percentage of germination in comparison with the chemical treatment (72%), although *T. harzianum* TH-4 reduced rot caused by the *F. solani* strain by 75%.

In the town of Santa María Tecomavaca, in the state of Oaxaca, Mexico, *T. harzianum* (T-H4) and the Mancozeb 80® chemical treatment presented the best response in the reduction of the mortality and severity of the disease in Miahuatenco chili plants 40 dat.

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

3F), de tamaño promedio de 2.4 x 4.1 µm de ancho y 11.8 x 36.4 µm de largo (Barnett y Hunter, 1998). Así también se observaron clamidosporas (Figura 3E) con un diámetro entre de 8.4-10.5 µm, características morfométricas peculiares de estos fitopatógenos reportados por Montealegre *et al.* (2003).

## CONCLUSIONES

Las cepas *T. harzianum* (TH-4) y *T. koningiopsis* (T-K11), mostraron antagonismo clase II y III respectivamente, ejercido en *F. solani* en la escala de Bell, además, *T. harzianum* TH-4 mostró mayor tasa de desarrollo, velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de crecimiento radial PICR sobre *F. solani* MX-MIC 798 (53%) en condiciones *in vitro*.

En condiciones de vivero, *T. harzianum* TH-4 (82%) y *T. koningiopsis* T-K11 (74%) presentaron mejor respuesta en la germinación de plantas de chile variedad Miahuateco; presentando el porcentaje de germinación mayor en comparación al tratamiento químico (72%), sin embargo, *T. harzianum* TH-4 redujo en un 75% la podredumbre causada por la cepa *F. solani*.

En la comunidad de Santa María Tecomavaca en el estado de Oaxaca, México, *Trichoderma harzianum* (T-H4) y el tratamiento químico Mancozeb 80<sup>®</sup> presentaron la mejor respuesta en la reducción de mortalidad y severidad de la enfermedad de plantas de chile Miahuateco a los 40 ddt.

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2006. Plant Pathology. 5 Edition. Elsevier the Academic Press. London. 838 p.
- Al-Fadhil FA, Al-Abedy AN and Alkhafije DA. 2019. Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Egyptian Journal of Biological Pest control 29(47): e2752. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0145-5>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Hernández EO, Gayosso EM, Valenzuela NL and Cureño HJB. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs. hongos asociados a la marchitez de chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Andrade-Hoyos P, Silva-Rojas HV and Romero-Arenas O. 2020. Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persia americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado. Plants e1220. <https://doi.org/10.3390/plants9091220>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. USA. 241 p.
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Black LL, Green KS, Hartman LG and Poulos MJ. 1993. Pepper Diseases: A Field Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhuah, Taiwan. 98 p.
- Bokhari NA and Perveen K. 2013. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. African Journal of Microbiology Research 6(44): 7193-7197. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.956>
- Castillo-Aguilar C, Coh-Méndez D, Carrillo-Ávila E and Monsalvo-Espinosa A. 2015. Producción de planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Agroproductividad 8(4): 73-78. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/676>
- Chen ZH, Gao T, Liang SP, Liu KX, Zhou MG and Chen CJ. 2014. Molecular mechanism of resistance of *Fusarium fujikuroi* to benzimidazole fungicides. Fems microbiology letters 357(1): 77-84. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12504>
- Cole JS and Zvenyika Z. 1988. Integrated control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in tobacco transplants with *Trichoderma harzianum* and triadimenol. Plant Pathology 37(2): 271-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02073.x>
- Duarte-Leal Y, Lamz-Piedra A and Martínez-Coca B. 2017. Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc. Revista de Protección Vegetal 32(3): 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n3/rpv03317.pdf>
- Dubey SC, Suresh M and Singh B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. Biological control 40(1): 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.006>
- Ezziyyani M, Sánchez CP, Ahmed AS, Requena ME and Castillo MEC. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Anales de biología 26: 35-45. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30441>
- Gan H and Wickings K. 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. Agriculture, Ecosystems and Environment 246: 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.014>
- Guenoun K, Chattaoui M, Bouri M, Rhouma A, Naghmouchi K and Raies A. 2019. Biological control of growth promoting rhizobacteria against *verticillium* wilt of pepper plant. Biología 74: 237-250. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-00169-9>
- Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Alboreo F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L, Ruocco M, Lanzuise S, Woo S and Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp., su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopa-

- tógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2): 87-96. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a2.pdf>
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R and Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 35(1): 98-112. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hyder S, Inam UH, Bibi S, Humayun A, Ghuffar S and Iqbal S. 2017. Novel potential of *Trichoderma* spp., as biocontrol agent. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(4): 214-222. <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartC/5-3-244-140.pdf>
- Illa C, Andrés-Pérez A, Matias T and Pérez MA. 2019. Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(1): 119-131. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-6>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2017. Áreas geográficas. Coordenadas Oaxaca. (Consultado: 01 de julio de 2020). <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=20>
- Jagraj C, Vipul K, Seweta S, Adesh K and Vinit PS. 2018. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing tomato wilt. *Plant Pathology Journal* 17: 59-64. <https://doi.org/10.3923/ppj.2018.59.64>
- Launio CC, Labon KO, Bañez AM and Batani RS. 2020. Adoption and economic analysis of using biological control in Philippine highland farms: Case of *Trichoderma koningii* strain KA. *Crop Protection* e105177. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105177>
- Leroux P and Walker AS. 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 67(1): 44-59. <https://doi.org/10.1002/ps.2028>
- Madhavi M, Kumar CPC, Reddy DRR and Singht TK. 2006. Integrated management of wilt of chilli incited by *Fusarium solani*. *Indian Journal of Plant Protection* 34(2): 225-228.
- Mannai S, Jabnoun-Khiareddine H, Nasraoui B and Daami-Remadi M. 2018. *Rhizoctonia* root rot of pepper (*Capsicum annuum*): Comparative pathogenicity of causal agent and biocontrol attempt using fungal and bacterial agents. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 9(2): 431-439. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000431>
- Michel-Aceves AC, Hernández-Morales J, Toledo-Aguilar R, López JES and Romero-Rosales T. 2019. Capacidad antagonista de *Trichoderma* spp., nativa contra *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivos de Jamaica. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42(3): 235-241. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.235-241>
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Rebollo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ariza-Flores R and Barrios-Ayala A. 2005. Producción y efecto antagonista de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11:273-278. <https://www.redalyc.org/pdf/609/60911213.pdf>
- Montealegre J, Donoso S, Herrera R and Besoain X. 2003. Identificación de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como agente causal de la podredumbre del pie de tomate. *Boletín Micológico* 18: 53-55. <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/426/387>
- Morales ML, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2020. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(3): 434-449. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-7>
- Nagendran K, Loganathan M, Saha S, Mishra A, Pandey KK, Rai RM, Gupta S, Rai AB and Singh B. 2016. Biological management of wilt disease on chilli caused by *Fusarium solani*. *Vegetable Science* 43(2): 253-256. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:vgt&volume=43&issue=2&article=019>
- Nawrocka J, Małolepsza U, Szymczak K and Szczech M. 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, proteins, and mechanical strengthening in multi-layer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma* 255(1): 359-373. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-11571>
- Pérez-Carrasco LJ, Tornero-Campante M A, Escobedo-Garrido JS and Sandoval-Castro E. 2017. El chile poblano criollo en la cultura alimentaria del Alto Atoyac. *Estudios Sociales* 27(49): 47-66. <http://www.scielo.org.mx/pdf/estsoc/v27n49/0188-4557-estsoc-27-49-00047.pdf>
- Pérez-Torres E, Bernal-Cabrera A, Milanés-Virelles P, Sierra-Reyes Y, Leiva-Mora M, Marín-Guerra S and Monteagudo-Hernández O. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* 30(1): 17-26. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.142312>
- Perveen K, Haseeb A and Shukla PK. 2010. Effect of *Sclerotinia sclerotiorum* on the disease development, growth, oil yield and biochemical changes in plants of *Mentha arvensis*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17(4): 291-294. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.008>
- Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar F, Meza-Moller CA and Guzmán Ortiz JM. 2018. Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 16-34. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-1>
- Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Santillán-Mendoza R, Díaz-Celaya M and Fernández-Pavía SP. 2019. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-1>
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-Santos G, Vaquera-Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into *damping-off* infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress* 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>

- Rodríguez J, Olvera BVP, Muñoz AG, Corona BM, Manzo F and Liendo LS. 2007. Rescate *in situ* del chile Poblano en Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30(1): 25-32. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61030103>
- Romero-Arenas O, Amaro LJ, Damián HM, Valencia de Ita MA, Rivera A and Huerta LM. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *ITEA* 113(4): 313-324. <http://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Samson R, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T and Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Mycology* 78: 141-173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sánchez-García BM, Espinosa-Huerta E, Villordo-Pineda E, Rodríguez-Guerra R and Mora-Avilés MA. 2017. Identificación molecular y evaluación antagonista *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp., sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia* 51(1): 63-79. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063-en.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2020. Atlas Agroalimentario. 1080-2020. <https://www.gob.mx/siap>
- Suárez C, Fernández R, Valero N, Gámez R and Páez A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2): 35-43. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biot>
- Sundaramoorthy S and Balabaskar P. 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp., against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 1(3): 36-40. [https://www.jabonline.in/abstract.php?article\\_id=15](https://www.jabonline.in/abstract.php?article_id=15)
- Thangavelu R, Palaniswami A and Velazhahan R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 103(1): 259-263. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.026>
- Toledo-Aguilar R, López-Sánchez H, López PA, Guerrero-Rodríguez JDD, Santacruz-Varela A, and Huerta-de la Peña A. 2016. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de chile Poblano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(5): 1005-1015. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i5.227>
- Tsegaye-Redda ET, Ma J, Mei J, Li M, Wu B and Jiang X. 2018. Biological control of soilborne pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) of cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp. *Journal of Life Sciences* 12:1-12. <https://doi.org/10.17265/1934-7391/2018.01.001>
- Vázquez-Casarrubias G, Escalante-Estrada JAS, Rodríguez-González M, Ramírez-Ayala C and Escalante-Estrada LE. 2011. Edad al trasplante y su efecto en el crecimiento y rendimiento de chile Apaxtleco. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(1): 61-65. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rchsh/v17n1/v17n1a10.pdf>
- Yedidia I, Benhamou N and Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 1061-1070. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1061-1070.1999>
- Zeravakis G, Philippoussis A, Ioannidou S and Diamantopoulou P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* 46(3): 231-234. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>
- Ziogas BN and Malandrakis AA. 2015. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). In: Ishii H., Hollomon D. (eds) *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer, Tokyo. 199-216 pp. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13)



# Efficacy of microbial antagonists and chitin in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in postharvest of mango cv. Azúcar

## Eficacia de antagonistas microbianos y quitina en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en poscosecha de mango cv. Azúcar

Yimmy Alexander Zapata-Narváez, Luisa Fernanda Izquierdo-García, Blanca Lucía Botina-Azaín, Camilo Rubén Beltrán-Acosta\*, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Agrosavia. Centro de Investigación Tibaitatá - Km 14 Vía Mosquera, Cundinamarca-Colombia. \*Autor para correspondencia: cbeltran@agrosavia.co

Recibido: 21 de Febrero, 2021. Aceptado: 17 de Abril, 2021.

Zapata-Narváez YA, Izquierdo-García LF, Botina-Azaín BL and Beltrán-Acosta CR. 2021. Efficacy of microbial antagonists and chitin in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in postharvest of mango cv. Azúcar. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 248-265.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2102-1>

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 29, 2021.

**Resumen.** Se determinó la eficacia en el control de la antracnosis en la poscosecha de mango cv. Azúcar sometiendo la fruta a un tratamiento hidrotérmico a 53 °C, realizando posteriormente dos heridas de 2 mm de profundidad, luego se realizó la inmersión en suspensiones de los antagonistas o quitina en diferentes concentraciones, posteriormente en cada herida se inoculó una gota de 5 µL del patógeno, almacenando la fruta a 23 °C. De este ensayo se seleccionó a *Lysinibacillus xylaniticus* Ap282, *Rhodotorula glutinis* Lv316 y quitina

**Abstract.** The efficacy in the control of mango cv. Azúcar anthracnose in postharvest was determined by subjecting the fruit to a hydrothermal treatment at 53 °C; later two wounds of 2 mm deep were made and the fruits were immersed in suspensions of the antagonists or chitin in different concentrations. After, each wound was inoculated with a drop of 5 µL of the pathogen, and the fruits were storage at 23 °C. From this trial, *Lysinibacillus xylaniticus* Ap282, *Rhodotorula glutinis* Lv316, and chitin 10 mg L<sup>-1</sup> were selected for showing an efficacy in the disease control of 49% to 69%. The bioassay was repeated, but adding the chitin to the hydrothermal treatment and evaluating the control of the disease from pathogen's quiescent infections, storage the fruit at 13 °C. The combination of hydrothermal treatment and tempered of the fruit in the AP282 suspension presented the highest efficacy in the control of anthracnose (84%) in fruits inoculated with the pathogen, while, in the disease control from the quiescent infections, the combination of hydrothermal treatment adding the chitin or

(10 mg L<sup>-1</sup>) por presentar una eficacia del 49% al 69% en el control de la enfermedad. El bioensayo se repitió, adicionando la quitina al tratamiento hidrotérmico y evaluando el control de la enfermedad a partir de infecciones quiescentes del patógeno, almacenando la fruta a 13 °C. La combinación del tratamiento hidrotérmico y el temperado de la fruta en la suspensión de AP282 presentó la mayor eficacia en el control de la antracnosis (84%) en frutos inoculados con el patógeno, mientras que, en el control de la enfermedad a partir de las infecciones quiescentes la combinación del tratamiento hidrotérmico adicionando la quitina o el temperado en suspensiones microbianas presentó una eficacia del 83 al 89%.

**Palabras clave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, tratamiento hidrotérmico, eficacia, infecciones quiescentes.

En Colombia se cultivan diferentes variedades de mango (*Mangifera indica*) con una producción de 321,083 t en 28,000 ha, para el consumo en fresco y el procesamiento agroindustrial (MINAGRICULTURA, 2018). Este cultivo es importante en el aporte de la economía campesina ya que es típicamente minifundista (Alvarado y Moreno, 2012) y tiene características de baja tecnificación y asistencia técnica. Así mismo, se cultiva en predios manejados con buenas prácticas de acuerdo con la experiencia y capacidad económica de inversión de los productores (Asmar, 2021). El mango cv. Azúcar es una variedad colombiana que se caracteriza por ser un fruto ovalado y pequeño, de escasa fibra, buen aroma y sabor; presenta, especialmente en la pulpa madura, un contenido importante en fenoles totales y carotenoides, que le confieren potencial antioxidante, así como compuestos activos y nutricionales benéficos para la salud y es considerado como un

tempering in the microbial suspensions showed an efficacy of 83% to 89%.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, hydrothermal treatment, efficacy, quiescent infections.

Different varieties of mango (*Mangifera indica*) are cultivated in Colombia, with a production of 321,083 t in 28,000 ha, for fresh consumption and agro-industrial processing (MINAGRICULTURA, 2018). This crop is important for its contribution to farmers economy, since it is typically produced on a small scale (Alvarado and Moreno, 2012), it has low technification characteristics and low technical assistance. Additionally, it is cultivated on fields managed with good practices according to the experience and ability for economic investment of the farmers (Asmar, 2021). Mango cv. Azúcar is a colombian variety, characterized for being and oval and small fruit, with little fiber, pleasant in aroma and flavor; particularly, the mature pulp, contains important amounts of total phenols and carotenoids, which give antioxidant potential, as well as active and nutritional compounds that are beneficial to human health. It is considered a very profitable fruit, since it has the best price in comparison with other varieties, 10 months of the year (Corrales-Bernal *et al.*, 2014).

It is therefore necessary to continue working on the implementation of pre and postharvest technologies that help obtain fruits with phytosanitary and organoleptic quality to positioning the mango cv. Azúcar in internal and external markets. This has been done for the past three years by farmers with mango cv. Azúcar plantations located in the department of Magdalena, where exports have increased between 2018 and 2020, with an annual growth of 33% (Asmar, 2021).

fruto muy rentable porque presenta el mejor precio comparado con otras variedades durante 10 meses del año (Corrales-Bernal *et al.*, 2014).

Consecuentemente, se hace necesario continuar trabajando en la implementación de tecnologías en pre y poscosecha que permitan obtener frutos de calidad fitosanitaria y organoléptica para posicionar el mango Azúcar en los mercados internos y externos. Esto lo han realizado durante los últimos tres años, productores que tienen predios cultivados con mango Azúcar ubicados en el departamento del Magdalena, en donde se han incrementado las exportaciones entre 2018 y 2020, con un crecimiento anual del 33% (Asmar, 2021).

Sin embargo, una de las principales limitantes en su producción y poscosecha es la antracnosis, enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, la cual es la más importante en la producción de mango en el mundo (Kamle y Kumar, 2016). En campo, el hongo produce infecciones quiescentes en frutos inmaduros, las cuales se desarrollan durante la poscosecha a causa del ambiente y maduración del fruto, provocando pérdidas que pueden superar el 50% (Arauz, 2000; Prusky *et al.*, 2013; Kamle y Kumar, 2016). Su control se realiza principalmente con fungicidas sistémicos; aunque son eficientes, presentan efectos negativos como la residualidad o la generación resistencia en el hongo, siendo su uso cada vez menos aceptados por los países importadores, ya que su toxicidad es potencialmente nociva para el consumidor (Bautista-Rosales *et al.*, 2014; Chechi *et al.*, 2019).

De acuerdo con esto, el uso de alternativas de control inocuas y eficientes se plantea como una necesidad. El control biológico es una estrategia que involucra el uso de microorganismos como levaduras y bacterias, las cuales se caracterizan por tener rápido crecimiento sobre la superficie vegetal, con la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos y por tolerar, en el

However, one of the main limitations in its production and postharvest is the anthracnose, which is the most important disease in mango production worldwide caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Kamle and Kumar, 2016). In the field, the fungus produces quiescent infections in immature fruits, which develop during postharvest, due to the environment and the maturation of the fruit, causing losses that can exceed to 50% (Arauz, 2000; Prusky *et al.*, 2013; Kamle and Kumar, 2016). It is mainly controlled using systemic fungicides which, although efficient, have negative effects such as residuality or the generation of resistance of the fungus, and its use is therefore becoming less accepted by importing countries, since its toxicity is potentially harmful to consumers (Bautista-Rosales *et al.*, 2014; Chechi *et al.*, 2019).

Given this, the use of innocuous and efficient control alternatives is presented as a necessity. Biological control is a strategy that involves the use of microorganisms such as yeast and bacteria, which have a rapid growth on the surface of the plant, produce metabolites that inhibit the growth of plant pathogens and tolerate, in the case of some strains, extreme conditions such as low temperatures or activity of water (aw) and the presence of fungicides (Lastochkina *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2013). Likewise, the application to the fruits of biopolymers such as chitin is proposed, since its cationic character presents antifungal activity mediated by the interaction of its free amino groups (positively charged in an acidic medium), modifying the permeability of the plasmatic membrane, altering its function, or forming a film on the fruit that changes the internal atmosphere, favoring its conservation (Ban *et al.*, 2015; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Some studies have proven the efficacy of alternatives for the control of postharvest diseases such as physical treatments in fruits and vegetables

caso de algunas cepas, condiciones extremas como bajas temperaturas, baja actividad de agua (aw) y presencia de fungicidas (Lastochkina *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2013). De igual manera se plantea la aplicación de biopolímeros como la quitina al fruto, ya que su carácter catiónico presenta actividad antifúngica mediada por la interacción de sus grupos amino libres (cargados positivamente en medio ácido), modificando la permeabilidad de la membrana plasmática, alterando su función, o formando películas en el fruto que cambian la atmósfera interna favoreciendo su conservación (Ban *et al.*, 2015; Bautista-Baños *et al.*, 2006

Algunos estudios han mostrado la eficacia de alternativas para el manejo de enfermedades poscosecha como tratamientos físicos en frutas y en vegetales (Usall *et al.*, 2016) dentro de los cuales se encuentra la hidroterapia, realizada por inmersión, enjuague o cepillado; en la inmersión se aplican temperaturas entre 43 °C y 53 °C por periodos que van de minutos hasta 2 horas de acuerdo con la especie de la fruta y estado de madurez, en tanto que el enjuague y cepillado son empleados de 10 a 25 segundos a temperaturas entre 43 °C y 53 °C (Fallik, 2004). El tratamiento por inmersión es el más reportado y puede llegar a estimular respuestas de defensa contra la antracnosis en frutos sin afectar negativamente su calidad sensorial y física (Vilaplana *et al.*, 2018), siendo efectivo contra otros patógenos en poscosecha como *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* (Fallik *et al.*, 1996).

Se ha observado que el uso combinado de diferentes alternativas puede aumentar el efecto de las alternativas individuales (Perez *et al.*, 2016). El éxito del uso de las alternativas combinadas radica sus diferentes modos de acción, por ejemplo, los tratamientos físicos actúan sobre las superficies sellando o curando aberturas y como desinfectantes de superficies limitando los sitios de infección del patógeno, mientras que la aplicación posterior de

(Usall *et al.*, 2016), including hydrotherapy, carried out by immersion, rinsing or brushing. In immersion, temperatures of 43 °C to 53 °C are applied for periods lasting between a few minutes and 2 hours, depending on the species of the fruit and the stage of maturity, whereas rinsing and brushing are used for 10 to 25 seconds at temperatures ranging from 43 °C to 53 °C (Fallik, 2004). The immersion treatment is the most commonly reported and may lead to the stimulation of responses of defense against anthracnose in fruits, without affecting its sensorial and physical quality (Vilaplana *et al.*, 2018), making it efficient against pathogens in postharvest such as *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* (Fallik *et al.*, 1996).

It has been observed that the combined use of different alternatives may increase the effect of individual alternatives (Perez *et al.*, 2016). The success of the use of combined alternatives lies in their modes of action. For example, physical treatments act on the surfaces, sealing or curing openings, and as surface disinfectants, limiting the infection sites of the pathogen, whereas the posterior application of antagonists or bioactive compounds provides a persistent protective action through the restriction of secondary diseases (Zhang *et al.*, 2017).

Considering the potential of the use of these alternatives in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* during the postharvest of mango cv. Azúcar in Colombia, the aim of this study was to determine their efficacy with the use of microbial antagonists, a hydrothermal treatment at 53 °C and different concentrations of chitin, as well as the combination of the best treatments.

## MATERIALS AND METHODS

This investigation was carried out in the Agricultural Microbiology Laboratory of the

antagonistas o compuestos bioactivos provee una acción protectora persistente a través de la restricción de infecciones secundarias (Zhang *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta el potencial de uso de estas alternativas en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* durante la poscosecha de mango Azúcar en Colombia, el objetivo de este estudio fue determinar la eficacia mediante el uso de antagonistas microbianos, un tratamiento hidrotérmico a 53 °C y quitina en diferentes concentraciones, así como la combinación de los mejores tratamientos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Tibaitatá de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA.

**Material vegetal y patógeno.** Se utilizaron frutos de mango variedad Azúcar (susceptible a la antracnosis) en etapa de madurez fisiológica (ligeramente verde con tonalidad amarilla rosada y pulpa amarilla), asintomáticos a cualquier patología, con un tamaño entre 8 a 10 cm y peso promedio de 100 g, provenientes de un cultivo comercial del municipio de Ciénaga (departamento del Magdalena, Colombia). Para reducir la expresión de infecciones quiescentes del patógeno, la fruta se sometió a un tratamiento hidrotérmico a 53 °C por 5 minutos (baño termostataado Memmert WNB 14) y atemperando por inmersión en agua a 17 °C por 10 min, posteriormente con una aguja de disección estéril se realizaron dos heridas de 2 mm de profundidad en una de las caras del fruto, separadas 5 cm entre sí (basado y modificado de la metodología de Trinidad-Angel *et al.*, (2017)).

Para seleccionar el patógeno se evaluaron tres aislamientos (Y1, Y2, Y3), seleccionando Y3 (*C.*

Tibaitatá Research Center of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA.

**Plant and pathogenic material.** Azúcar mango variety fruits (susceptible to anthracnose) in the stage of physiological maturity (slightly green with a pinkish-yellow tone and a yellow pulp), asymptomatic to any pathology, sized 8 to 10 cm and an average weight of 100 g, from a commercial plantation in the municipal area of Ciénaga were used (department of Magdalena, Colombia). To reduce the expression of quiescent infections of the pathogen, the fruit underwent a hydrothermal treatment at 53 °C for 5 minutes (Memmert WNB 14 waterbath) and tempering by immersion in water at 17 °C for 10 min, followed by producing two lesions, each 2 mm deep, with a sterilized dissection needle on one of the faces of the fruit, with a distance of 5 cm from each other (based on the methodology by Trinidad-Angel *et al.* (2017), modified).

To select the pathogen, three isolations were evaluated (Y1, Y2, Y3). Y3 (*C. gloeosporioides*) was selected from the Yulima variety of mangoes, identified by its morphology and selected due to its pathogenicity when carrying out Koch's postulates (data not shown). Conidia inoculum was obtained from cultures in Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid®) previously incubated at 25 °C for 10 days and adjusted to  $1 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> in sterile distilled water.

**Efficacy of antagonistic microorganisms in the control of anthracnose.** The AGROSAVIA Microorganism Germplasm Bank provided the antagonistic microorganisms characterized in previous studies and which displayed control over different pathogens (Zapata and Cotes, 2013; Díaz-García *et al.*, 2015), which were the bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 (Gámez *et al.*,

*gloeosporioides*), proveniente de frutos de mango variedad Yulima, identificado por su morfología y seleccionado por su patogenicidad al realizar los postulados de Koch (datos no mostrados). Su inóculo se obtuvo a partir de conidios colectados de cultivos en Agar Papa Dextrosa (PDA, Oxoid®) incubados a 25 °C durante 10 días, a partir de los cuales se realizó una suspensión de  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  en agua destilada estéril.

**Eficacia de microorganismos antagonistas en el control de la antracnosis.** El Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA proporcionó los microorganismos antagonistas que en estudios previos se caracterizaron y mostraron control sobre diferentes patógenos (Zapata y Cotes, 2013; Díaz-García *et al.*, 2015), los cuales correspondieron a las bacterias *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 (Gámez *et al.*, 2015), *Bacillus safensis* AP280 y *Lysinibacillus xylaniticus* AP282; y las levaduras *Candida oleophila* Lv037, *Pichia onychis* Lv297 y *Rhodotorula glutinis* Lv316 (Moreno *et al.*, 2012; Zapata *et al.*, 2011). Para su crecimiento, las bacterias fueron cultivadas en caldo Luria Bertani (LB, Oxoid®) y las levaduras en caldo extracto de malta y levadura (YM, Oxoid®) a 125 rpm, 28 °C durante 48 y 72 horas respectivamente. Para el inóculo se realizaron suspensiones en agua destilada estéril a concentraciones de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para las bacterias y  $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  para las levaduras. La fruta se inoculó mediante inmersión en las suspensiones de cada microorganismo durante 10 min; posteriormente se secaron a 18 °C y sobre las heridas se inoculó una gota de 5  $\mu\text{L}$  del patógeno.

**Eficacia de los aditivos quitinosos en el control de la antracnosis.** Se empleó quitina (Sigma® C7170) en concentraciones de 0.5; 0.8; 10; 100 y 1000  $\text{mg L}^{-1}$ . Se realizó la inmersión de la fruta en

2015), *Bacillus safensis* AP280 and *Lysinibacillus xylaniticus* AP282; and the yeasts *Candida oleophila* Lv037, *Pichia onychis* Lv297 and *Rhodotorula glutinis* Lv316 (Moreno *et al.*, 2012; Zapata *et al.*, 2011). In order for them to grow, the bacteria were cultivated in a Luria Bertani broth (LB, Oxoid®), and the yeasts, in a broth composed of malt extract and yeast (YM, Oxoid®) at 125 rpm, 28 °C for 48 and 72 hours, respectively. For the inoculant, suspensions were made in sterile distilled water at concentrations of  $1 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$  for the bacteria and  $1 \times 10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  for the yeasts. The fruit was inoculated by immersion in the suspensions of each microorganism for 10 min, they were later dried at 18 °C and a 5  $\mu\text{L}$  drop of the pathogen was inoculated on the lesions.

**Efficacy of chitinous additives in the control of anthracnose.** Chitin (Sigma® C7170) was used in concentrations of 0.5; 0.8; 10; 100 and 1000  $\text{mg L}^{-1}$ . The fruit was immersed in the suspension of the additive in each defined concentration for 10 min, dried at 18 °C and 5  $\mu\text{L}$  drop of the pathogen was inoculated on the lesions.

**Efficacy of the combination of alternatives in the control of anthracnose in mangoes inoculated with *C. gloeosporioides*.** Four treatments were proposed to determine the efficacy in the control of anthracnose in mangoes inoculated with *C. gloeosporioides* (Table 1). First, the hydrothermal treatment was carried out, followed by the lesions on the fruit and then depositing them in suspensions of controlling microorganisms or the concentration of chitin (10  $\text{mg L}^{-1}$ ) for 10 min. They were then inoculated with the pathogen at the concentration described earlier and storage in humid chambers.

**Efficacy in quiescent *C. gloeosporioides* infections:** The same treatments mentioned

la suspensión del aditivo en cada concentración definida por 10 min, se secaron a 18 °C y sobre las heridas se inoculó una gota de 5 µL del patógeno.

**Eficacia de la combinación de alternativas en el control de la antracnosis en mangos inoculados con *C. gloeosporioides*.** Se plantearon cuatro tratamientos para determinar la eficacia en el control de la antracnosis en mangos inoculados con *C. gloeosporioides* (Cuadro 1). Primero se realizó el tratamiento hidrotérmico, luego se realizaron las heridas en los frutos y se depositaron en las suspensiones de los microorganismos controladores o la concentración de quitina (10 mg L<sup>-1</sup>) durante 10 min, se secaron e inocularon con el patógeno a la concentración descrita previamente y se almacenaron en cámaras húmedas.

**Eficacia en infecciones quiescentes de *C. gloeosporioides*:** Se evaluaron los mismos tratamientos mencionados anteriormente (Cuadro 1) sobre infecciones quiescentes de *C. gloeosporioides* pero sin realizar inóculo del patógeno. Inicialmente se realizó el tratamiento hidrotérmico, posteriormente los frutos se dispusieron en las suspensiones de los microorganismos controladores durante 10 minutos; para el tratamiento que contenía quitina esta se agregó durante el tratamiento hidrotérmico; posteriormente se dejaron secar y se almacenaron en cámaras húmedas.

Para los tratamientos donde se determinó la eficacia de los microorganismos y las diferentes concentraciones de los sustratos quitinosos, los frutos se dispusieron en cámaras húmedas (Humedad relativa (HR) del 90%) almacenándolas a 23 °C durante siete días, condiciones óptimas para el patógeno y severas para la selección de las alternativas; por otra parte, los frutos correspondientes a la combinación de alternativas se almacenaron en cámaras húmedas a 13 °C durante 19 días como una aproximación al almacenamiento de la fruta.

above (Table 1) were evaluated on quiescent *C. gloeosporioides* infections, without inoculating the pathogen. The hydrothermal treatment was carried out, followed by the placement of the fruits in suspensions of controlling microorganisms for 10 minutes. For the treatment that contained chitin, it was added during the hydrothermal treatment. They were then left to dry and storage in humid chambers.

For the treatments in which the efficacy of the microorganisms and the different concentrations of chitinous substrates were determined, the fruits were placed in humid chambers (Relative humidity (RH) of 90%), storage at 23 °C for seven days, under conditions considered optimal for the pathogen and severe for the selection of alternatives. On the other hand, the fruits corresponding to the combination of alternatives were stored in humid chambers at 13 °C for 19 days as an approximation to the storage of the fruit.

**Variables evaluated.** As a response variable, we calculated the efficacy in the control of the disease by applying the Schneider-Orelli formula: Percentage of efficacy =  $((b - k) / (100 - k)) * 100$ , where b= area under the disease progress curve (AUDPC) in the treatment depending on the diameter of the lesion in fruits and k= AUDPC in the pathogen control (Koller *et al.*, 2016). The

**Cuadro 1. Combinación de tratamientos evaluados para el control de la antracnosis a partir de la inoculación de *C. gloeosporioides* Y3 en frutos de mango cv. Azúcar.**

**Table 1. Combination of treatments evaluated for the control of anthracnose from the inoculation of *C. gloeosporioides* Y3 in mango cv. Azúcar fruits.**

| Tratamiento                                 |
|---------------------------------------------|
| Control: 53 °C 5 min                        |
| 53 °C 5 min + AP282                         |
| 53 °C 5 min + Lv316                         |
| 53 °C 5 min + Quitina 10 mg L <sup>-1</sup> |

**VARIABLES EVALUADAS.** Como variable respuesta se calculó la eficacia en el control de la enfermedad, aplicando la fórmula de Schneider-Orelli: Porcentaje de eficacia =  $((b - k) / (100 - k)) * 100$ , donde b= área bajo la curva de la enfermedad (AUDPC) en el tratamiento de acuerdo con el diámetro de la lesión en los frutos y k= AUDPC en el control patógeno (Koller *et al.*, 2016). Se tomó en cuenta la distribución irregular de las lesiones de la enfermedad, por lo que en las infecciones quiescentes se empleó la escala de severidad de la enfermedad de Brodrick (1978, citado por Corkidi *et al.*, 2006) (Cuadro 2, Figura 1).

**DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS.** Los bioensayos se establecieron bajo un diseño de bloques completamente al azar, la unidad experimental consistió en tres frutos, con tres repeticiones y dos réplicas, contando con un control sin tratar y un control patógeno. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de

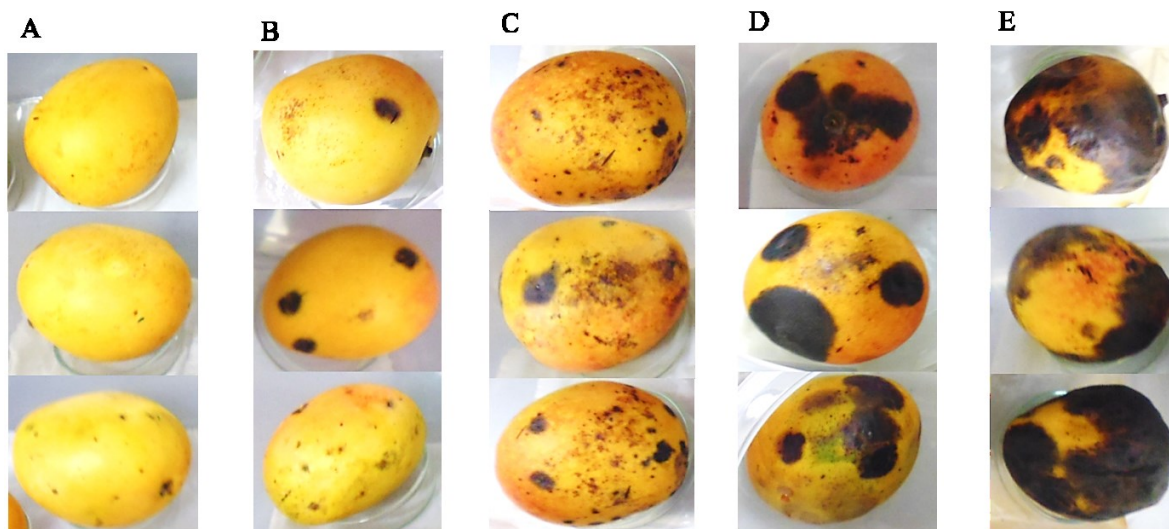
**Cuadro 2.** Escala para la evaluación de severidad de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en mango cv. Azúcar. Valores en porcentaje de área del fruto con síntomas.

**Table 2.** Scale to evaluate the severity of anthracnose caused by *C. gloeosporioides* in mango cv. Azúcar. Values as percentages of the area of the fruits with symptoms.

| Nivel | Área afectada |
|-------|---------------|
| 0     | 0 %           |
| 1     | 1-5 %         |
| 2     | 6-9 %         |
| 3     | 10-49 %       |
| 4     | 50-100 %      |

irregular distribution of the lesions of the disease were taken into consideration and therefore, in quiescent infections, Brodrick's disease severity scale (1978, cited by Corkidi *et al.*, 2006) was used (Table 2, Figure 1).

Experimental design and data analysis. Bioassays were established under a completely



**Figura 1.** Escala de severidad para la evaluación de antracnosis en mango cv. Azúcar, apariencia de los frutos en cada nivel de severidad. A. nivel 0, B. nivel 1, C. nivel 2, D. nivel 3, E. nivel 4.

**Figure 1.** Scale of severity for the evaluation of anthracnose in mango cv. Azúcar, appearance of the fruits in each level of severity. A. level 0, B. level 1, C. level 2, D. level 3, E. level 4.



Tukey ( $p \leq 0.05$ ), empleando el software estadístico Statistix 10.0.

## RESULTADOS

**Eficacia de microorganismos antagonistas en el control de la antracnosis.** Se observó una diferencia en el desempeño de los microorganismos entre las dos réplicas realizadas en tiempos diferentes, pudiendo estar influenciado por la incidencia de las infecciones quiescentes; sin embargo, para la réplica uno en los tratamientos AP282, Bs006 y Lv316 se observó la mayor eficacia en el control de la enfermedad con valores entre el 62% y 65%, mientras que en la réplica dos la mayor eficacia se obtuvo con AP282 (49%) siendo además el tratamiento más consistente de acuerdo con la réplica uno (Figura 2).

random block design. The experimental unit consisted of three fruits, with three repetitions and two replicates, including an untreated control and one pathogenic control. An analysis of variance was carried out, along with Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ), using the statistics software Statistix 10.0.

## RESULTS

**Efficacy of antagonistic microorganisms in the control of anthracnose.** A difference was noted in the performance of the microorganisms between the two replicates carried out in different times, possibly under the influence of the quiescent infections. However, in replicate one the treatments AP282, Bs006 and Lv316 displayed the highest efficacy in the control of the disease, with values between 62% and 65%, whereas in replicate two, the

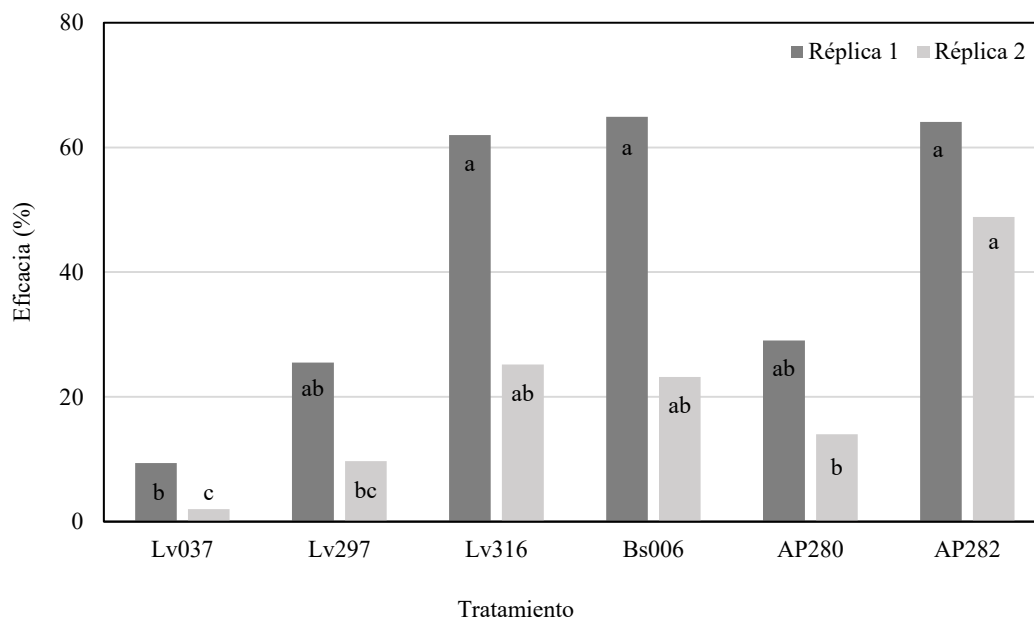


Figura 2. Eficacia de los antagonistas microbianos en la reducción de la antracnosis en frutos de mango cv. Azúcar inoculados con *C. gloeosporioides* Y3 después de siete días de almacenamiento a 23 °C. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (\*=  $P > 0.05$ ).

Figure 2. Efficacy of microbial antagonists in the reduction of anthracnose in mango cv. Azúcar fruits inoculated with *C. gloeosporioides* Y3 after storage for 7 days at 23 °C. Columns with the same letter are not significantly different, according to Tukey's test (\*=  $P > 0.05$ ).

**Eficacia de los aditivos quitinosos en el control de la antracnosis.** Las diferentes concentraciones de quitina evaluadas presentaron algún porcentaje de control; sin embargo, la concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> con una eficacia del 42% en la réplica uno y 49% en réplica dos presentó la mayor protección frente al crecimiento de *C. gloeosporioides*, siendo además el tratamiento más consistente (Figura 3).

**Eficacia de la combinación de alternativas en el control de la antracnosis en mangos inoculados con *C. gloeosporioides*.** Todos los tratamientos mostraron algún nivel de control sobre el desarrollo de la enfermedad en los mangos inoculados con *C. gloeosporioides*; sin embargo, la combinación del tratamiento hidrotérmico y el temperado de los frutos en la suspensión de *L. xyliniticus* AP282 presentó el mayor control con una eficacia del 84%,

highest efficacy was obtained with AP282 (49%), which was also the most consistent treatment in accordance with the first replicate (Figure 2).

**Efficacy of chitinous additives in the control of anthracnose.** The different concentrations of chitin evaluated displayed some percentage of control, although the concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> with an efficacy of 42% in replicate one and 49% in replicate two presented the greatest protection against the growth of *C. gloeosporioides*, and was also the most consistent treatment (Figure 3).

**Efficacy of the combination of alternatives in the control of anthracnose in mangoes inoculated with *C. gloeosporioides*.** All treatments displayed some level of control on the development of the disease in mangoes inoculated with *C.*

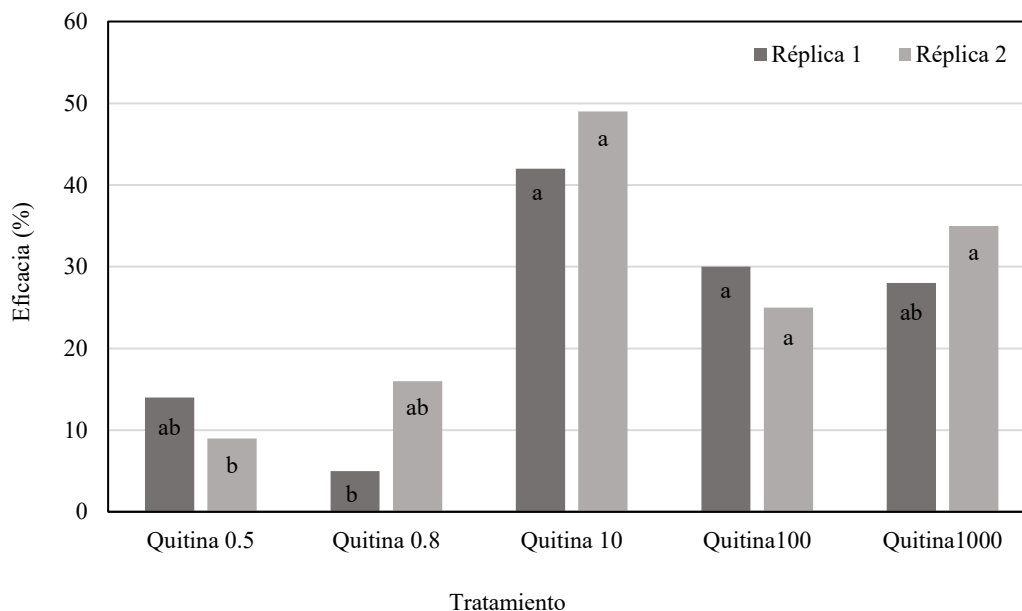


Figura 3. Eficacia de la quitina en diferentes concentraciones sobre la reducción de la antracnosis en frutos de mango cv. Azúcar inoculados con *C. gloeosporioides* Y3 después de siete días de almacenamiento a 23 °C. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (\*= P>0.05).

Figure 3. Efficacy of chitin in different concentrations on the reduction of anthracnose in mango cv. Azúcar fruits inoculated with *C. gloeosporioides* Y3 after storage for seven days at 23 °C. Columns with the same letter are not significantly different, according to Tukey's test (\*= P>0.05).

en tanto que al evaluar únicamente el tratamiento hidrotérmico se obtuvo el menor desempeño con un 19% de eficacia (Figura 4).

**Eficacia de la combinación de alternativas en el control de la antracnosis a partir de infecciones quiescentes de *C. gloeosporioides*.** Con respecto a la reducción en la expresión de las infecciones quiescentes, se observó que al combinar el tratamiento hidrotérmico con la adición de quitina o el posterior temperado de los frutos en las suspensiones de *L. xylaniticus* AP282 o *R. glutinis* Lv316, se redujo la incidencia de las infecciones con mayor eficacia en el control de la enfermedad en comparación con solo el tratamiento hidrotérmico, y aunque estos tratamientos superaron el 80% de eficacia fue la combinación de la hidroterapia y la inmersión en la Lv316 con un 89% el más destacado (Figuras 5 y 6).

*gloeosporioides*. However, the combination of the hydrothermal process and the tempering of the fruits in the *L. xylaniticus* AP282 suspension presented the greatest control, with an efficacy of 84%, whereas an evaluation of only the hydrothermal treatment presented the lowest performance, with an efficacy of 19% (Figure 4).

**Efficacy of the combination of alternatives in the control of anthracnose from quiescent *C. gloeosporioides* infections.** Regarding the reduction in the expression of quiescent infections, combining the hydrothermal treatment with the addition of chitin or the later tempered of the fruits in the *L. xylaniticus* AP282 or *R. glutinis* Lv316 suspensions reduced the incidence of infections with a greater efficacy in the control of the disease in comparison with the hydrothermal treatment alone, and although these treatments surpassed an efficacy

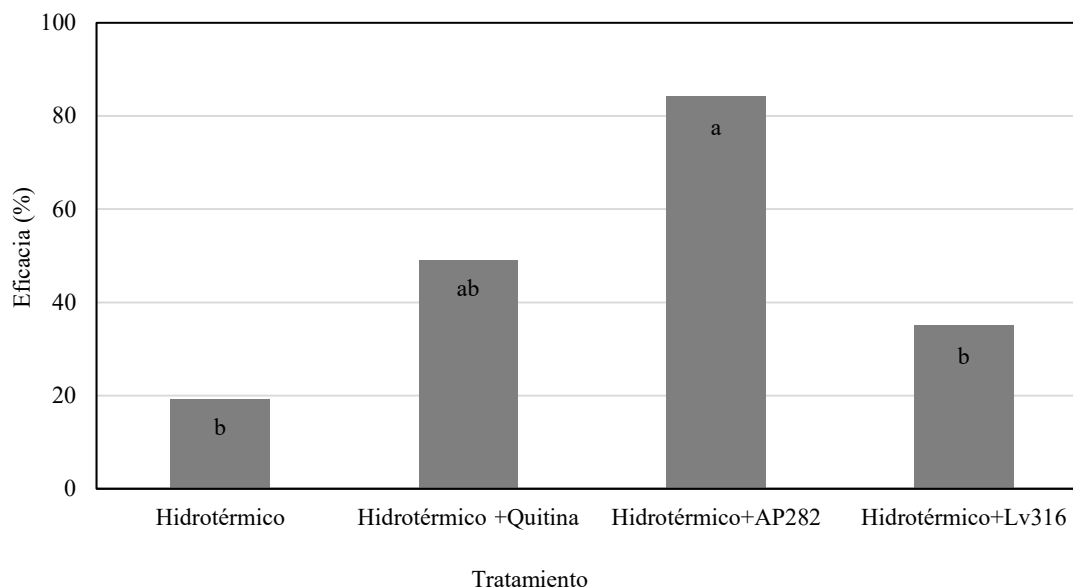


Figura 4. Eficacia de la combinación de tratamientos en la reducción de la antracnosis en frutos de mango cv. Azúcar inoculados con *C. gloeosporioides* Y3 después de 15 días de almacenamiento a 13 °C. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (\*= P>0.05).

Figure 4. Efficacy of the combination of treatments in the reduction of anthracnose in mango cv. Azúcar fruits inoculated with *C. gloeosporioides* Y3 after storage for 15 days at 13 °C. Columns with the same letter are not significantly different, according to Tukey's test (\*= P>0.05).

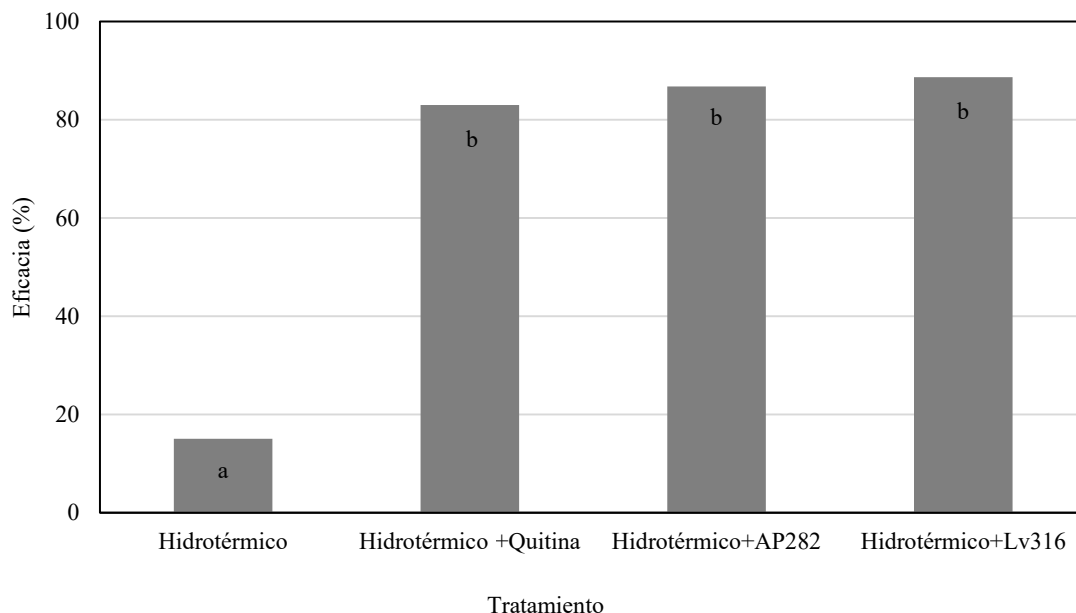


Figura 5. Eficacia de la combinación de tratamientos en la reducción de la antracnosis a partir de infecciones quiescentes de *C. gloeosporioides* en frutos de mango cv. Azúcar después de 19 días de almacenamiento a 13 °C. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (\*= P>0.05).

Figure 5. Efficacy of the combination of treatments in the reduction of anthracnose from quiescent infections of *C. gloeosporioides* in mango cv. Azúcar fruits after storage for 19 days at 13 °C. Columns with the same letter are not significantly different, according to Tukey's test (\*= P>0.05).

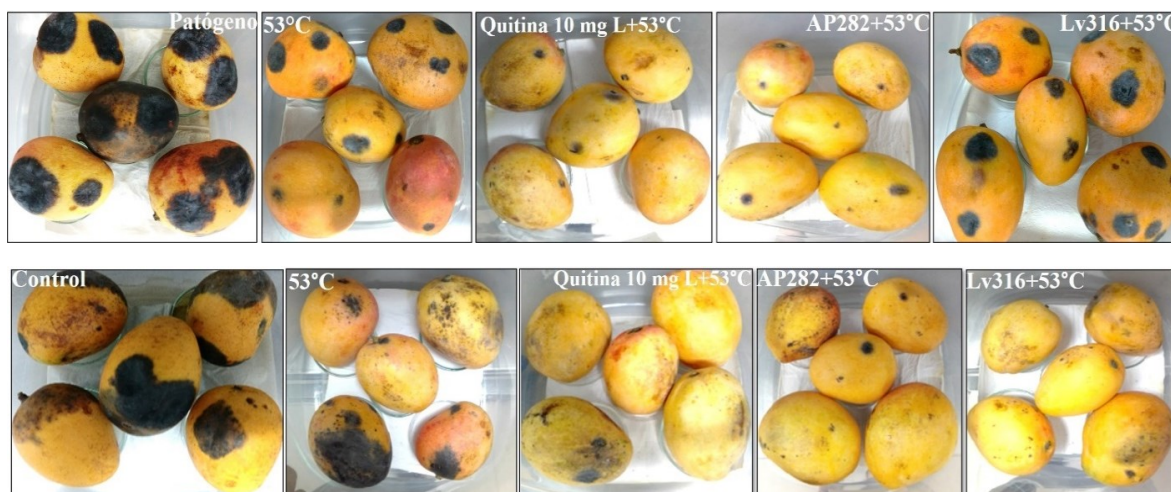


Figura 6. Síntomas de antracnosis en frutos de mango cv. Azúcar tratados con la combinación de tratamientos en almacenamiento a 13 °C. Superior: Frutos inoculados con *C. gloeosporioides* Y3 después de 15 días de almacenamiento. Inferior: Infecciones quiescentes de *C. gloeosporioides* en los frutos tratados después de 19 días de almacenamiento.

Figure 6. Symptoms of anthracnose in mango cv. Azúcar fruits treated with the combination of treatments storage at 13 °C. Top: Fruits inoculated with *C. gloeosporioides* Y3 after 15 days of storage. Bottom: Quiescent infections of *C. gloeosporioides* in treated fruits after 19 days of storage.

## DISCUSIÓN

*Lysinibacillus xylaniticus* AP282, *R. glutinis* Lv316 y quitina (10 mg L<sup>-1</sup>) mostraron control de la antracnosis en los frutos inoculados con el patógeno en condiciones de almacenamiento que favorecían su desarrollo (HR del 90% a 23 °C) y posteriormente, al evaluarse en una condición más cercana al almacenamiento comercial (13 °C) mantuvieron o aumentaron su protección y redujeron además la expresión de infecciones quiescentes. Mientras que la aplicación única del tratamiento hidrotérmico mostró una eficacia del 19%, pero al combinarse con el temperado en la suspensión de los antagonistas o la adición de quitina, la eficacia aumentó, particularmente en el caso de las infecciones quiescentes.

En este sentido, el desarrollo de *C. gloeosporioides* puede limitarse por la ausencia de nutrientes como nitrógeno orgánico y microelementos como hierro, necesarios para la germinación de los conidios y posteriores procesos de infección de tejidos, de igual forma por la exposición a metabolitos producidos por microorganismos antagonistas que puedan tener acción sobre el desarrollo del patógeno a partir de las infecciones quiescentes (Liu *et al.*, 2013).

Bacterias y levaduras presentan mecanismos de acción que pueden inhibir el desarrollo de diferentes patógenos, siendo estos la competencia por espacio y nutrientes, la producción de antibióticos, sideróforos, el parasitismo y la inducción de respuestas de defensa en las plantas (Rungjindamai, 2016). Aunque se conoce muy poco de los mecanismos de acción de *L. xylaniticus*, se sabe que otras especies de este género, como *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 tienen la capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Aspergillus* sp., *A. alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia lunata* y *Sclerotinia* sp., mediante la secreción de sideróforos, ácido

of 80%, the combination of hydrotherapy and the immersion in Lv316 was the most outstanding, with 89% (Figures 5 and 6).

## DISCUSSION

*Lysinibacillus xylaniticus* AP282, *R. glutinis* Lv316 and chitin (10 mg L<sup>-1</sup>) proved to control the anthracnose in the fruits inoculated with the pathogen under storage conditions that favors their development (RH of 90% at 23 °C) and afterwards, when evaluating under a condition nearer to commercial storage (13 °C), they maintained or increased their protection and also reduced the expression of quiescent infections. Meanwhile, the single application of the hydrothermal treatment displayed an efficacy of 19%, but when combining it with tempering in the suspension of antagonists or adding chitin, its efficacy increased, particularly in the case of quiescent infections.

In this sense, the development of *C. gloeosporioides* may be limited by the absence of nutrients such as organic nitrogen and microelements such as iron, needed in the germination of conidia and later tissue infection processes, as well as by the exposure to metabolites produced by antagonistic microorganisms that may take action on the pathogen from quiescent infections (Liu *et al.*, 2013).

Bacteria and yeasts display action mechanisms that may inhibit the development of different pathogens, namely, competition for space and nutrients, the production of antibiotics, siderophores, parasitism and the induction of defense responses in plants (Rungjindamai, 2016). Although little is known on the action mechanisms of *L. xylaniticus*, other species of this genus, such as *Lysinibacillus sphaericus* ZA9, are known to have the ability to inhibit the growth of

cianhídrico (HCN), quitinasas, proteasas y lipasas, compuestos tipo clicloalcano y quinolina (Naureen *et al.*, 2017). Sin embargo, para tener claridad con respecto a cómo *L. xylaniticus* AP282 ejerce control sobre *C. gloeosporioides* Y3 es necesario determinar sus mecanismos de acción.

De otra parte, *R. glutinis* puede competir por espacio y nutrientes con diferentes patógenos, estudios han demostrado la capacidad de esta levadura para colonizar heridas en frutos de fresa y peras, observando una rápida colonización de heridas y control sobre *B. cinerea* a 20 °C sin afectar parámetros de calidad como pérdida de masa, firmeza y acidez (Zhang *et al.*, 2008, 2010). Adicionalmente, *R. glutinis* produce ácido rodotorúlico, sideróforo que quela el hierro presente en el sustrato ofreciéndole una ventaja competitiva (Calvente *et al.*, 1999). Para *R. glutinis* Lv316, en estudios desarrollados por Zapata y Cotes, (2013) se obtuvo un control del 60% para *B. cinerea* en cultivos comerciales de mora, superior al obtenido con aplicaciones de Prochloraz (58%) y Carbendazim (27%), relacionándose con la reducción de las infecciones quiescente en las flores.

En cuanto a la quitina por su carácter catiónico presenta actividad antifúngica mediada por la interacción de sus grupos amino libres (cargados positivamente en medio ácido) con los residuos negativos de las moléculas en la pared de los hongos, modificando la permeabilidad en la membrana plasmática provocando homeostasia iónica de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  causando la pérdida de pequeñas moléculas como fosfatos, nucleótidos y sustrato de reacciones enzimáticas que eventualmente afectan el metabolismo fúngico (Ban *et al.*, 2015; Bautista-Baños *et al.*, 2006). Lucas-Bautista *et al.* (2019), encontraron mayor contenido de quitinasas en cáscaras maduras de papaya liofilizadas (29.000 unidades de quitinasa (UQ)  $g^{-1}$ ) a las contenidas en cáscaras maduras congeladas (1.500 UQ  $g^{-1}$ ), además de

*Aspergillus* sp., *A. alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia lunata* and *Sclerotinia* sp. *in vitro*, by secreting siderophores, hydrocyanic acid (HCN), chitinases, proteases and lipases, cycloalkane and quinoline type compounds (Naureen *et al.*, 2017). However, in order to clarify how *L. xylaniticus* AP282 controls *C. gloeosporioides* Y3, its action mechanisms should be established.

On the other hand, *R. glutinis* may compete for space and nutrients with different pathogens. Studies have shown the ability of this yeast to colonize lesions in strawberry and pear fruits, observing a rapid colonization on lesions and control over *B. cinerea* at 20 °C without affecting quality parameters, such as the loss of mass, firmness and acidity (Zhang *et al.*, 2008, 2010). In addition, *R. glutinis* produces rhodotorulic acid, a siderophore that chelates the iron in the substrate, giving it a competitive advantage (Calvente *et al.*, 1999). For *R. glutinis* Lv316, a study carried out by Zapata and Cotes, (2013) obtained a control of 60% for *B. cinerea* in commercial berry crops, higher than that obtained with Prochloraz (58%) and Carbendazim (27%) applications, relating to the reduction of quiescent infections in the flowers.

Regarding chitin, its cationic character displays antifungal activity, mediated by the interaction of its free amino groups (positively charged in an acidic medium) with the negative residues in the molecules of the fungal walls modifying the permeability of the plasmatic membrane, causing the ionic homeostasis of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  causing the loss of small molecules such as phosphates, nucleotides and substrates of enzyme reactions that will eventually affect the fungal metabolism (Ban *et al.*, 2015; Bautista-Baños *et al.*, 2006). Lucas-Bautista *et al.* (2019) found a greater content of chitinases in mature lyophilized papaya skins (29.000 units of chitinases (UC)  $g^{-1}$ ) than those contained in mature frozen skins (1.500 UC  $g^{-1}$ ),

determinar que la quitina contenida en *C. gloeosporioides* como patógeno presente en la poscosecha de papaya puede tener hasta un 20.6%.

Si bien los tratamientos hidrotérmicos tienden a sellar o curar las heridas limitando los sitios de penetración para los patógenos (Schirra *et al.*, 2000), mediante la adición de quitina (10 mg L<sup>-1</sup>) o el temperado de la fruta en las suspensiones de *L. xylaniticus* AP282 o *R. glutinis* Lv316 se puede reducir las infecciones secundarias potencializando el control; sin embargo, es necesario desarrollar estudios tendientes a desarrollar bioplaguicidas con base en los microorganismos seleccionados, los cuales permitan su implementación a escala comercial, por otra parte, teniendo en cuenta la eficiencia de la quitina, es necesario contar con un sustituto comercial considerando que en este trabajo se utilizó quitina grado reactivo.

La inoculación de microorganismos antagonistas durante el temperado posterior al tratamiento hidrotérmico ha mostrado un alto potencial en la reducción de daños por patógenos en poscosecha, Karabulut y Baykal (2004) observaron que la incidencia de *B. cinerea* y *Penicillium expansum* en melocotones disminuía al someterse a un tratamiento hidrotérmico a 55 °C por 10 segundos y posterior inoculación con *C. oleophila*. De otra parte, es posible que con la aplicación conjunta de los antagonistas se pueda potenciar aún más el control, tal como lo demostraron Carrillo-Fasio *et al.*, (2005) quienes evaluaron aislamientos del género *Bacillus* y *Rhodotorula* solos y en combinación, encontrando un mayor control sobre antracnosis en frutos de mango Kent al aplicar la mezcla de biocontroladores.

En este sentido, el control de las infecciones quiescentes mediante el tratamiento hidrotérmico con adición de quitina a 10 mg L<sup>-1</sup> o el posterior temperado de la fruta en la suspensión de *R. glutinis* Lv316 o *L. xylaniticus* AP282 puede ser una

and they also determined that the chitin contained in *C. gloeosporioides* as a pathogen present in the papaya postharvest may contain up to 20.6%.

Despite the tendency of hydrothermal treatments to seal or cure lesions, limiting the areas of penetration for the pathogens (Schirra *et al.*, 2000), with the action of chitin (10 mg L<sup>-1</sup>) or the tempering of the fruit in the suspensions of *L. xylaniticus* AP282 or *R. glutinis* Lv316, it is possible to reduce secondary infections by reinforcing control. However, studies must be carried out to develop biopesticides based on the selected microorganisms to allow their implementation on a commercial scale. On the other hand, considering the efficacy of chitin, it is necessary to have a commercial substitute, considering that this study used reactive grade chitin.

The inoculation of antagonistic microorganisms during the tempering after the hydrothermal treatment has shown a high potential for the reduction of damages by pathogens in postharvest. Karabulut and Baykal (2004) observed that the incidence of *B. cinerea* and *Penicillium expansum* in peaches decreased with a hydrothermal treatment at 55 °C for 10 seconds followed by inoculation with *C. oleophila*. On the other hand, it is possible that with the combined application of the antagonists, the control may be greater, as proven by Carrillo-Fasio *et al.* (2005), who evaluated isolations of the genus *Bacillus* and *Rhodotorula* on their own and combined, finding a greater control of anthracnose in Kent mango fruits when applying the mixture of biocontrol agents.

In this sense, controlling quiescent infections with the hydrothermal treatments with the addition of chitin at 10 mg L<sup>-1</sup> or the later tempering of the fruit in the suspension of *R. glutinis* Lv316 or *L. xylaniticus* AP282 may be a strategy to treat the mango cv. Azúcar immediately after its harvest, allowing the microorganisms in the fruit

estrategia para tratar el mango Azúcar inmediatamente después de su cosecha, permitiendo el establecimiento de los microorganismos en la fruta para aumentar su capacidad protectora durante el almacenamiento.

## CONCLUSIONES

La combinación del tratamiento hidrotérmico a 53 °C por 5 minutos con adición de quitina a 10 mg L<sup>-1</sup> o el posterior temperado de los mangos en las suspensiones de *R. glutinis* Lv316 o *L. xyliniticus* AP282 presentó una eficacia del 83 al 89% en el control de la antracnosis originada partir de las infecciones quiescentes de *C. gloeosporioides*, alternativas que pueden considerarse en el tratamiento poscosecha del mango cv. Azúcar.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) de Colombia y a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA por la financiación del proyecto “Evaluación de métodos y herramientas de prevención de Antracnosis en campo y poscosecha (Primera aproximación)” que permitió el desarrollo de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Alvarado JR y Moreno LA. 2012. Acuerdo de competitividad cadena productiva del mango en Colombia. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Mango/Normatividad/004%20-%20D.C.%20-%20Acuerdo%20Competitividad%20Cadena%20Mango.pdf>. (Consulta, marzo 2021).
- Arauz L. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84(6): 600–611. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.600>
- Asmar S. 2021. Productores de mango del Magdalena recibieron luz verde para exportar hacia Europa. Agronegocios. <https://www.agronegocios.co/agricultura/productores-de-mango-del-magdalena-recibieron-luz-verde-para-exportar-hacia-europa-3146069>. (Consulta, marzo 2021).

to establish and therefore, increase their protective ability during storage.

## CONCLUSIONS

The combination of the hydrothermal treatment at 53 °C for 5 minutes with the addition of chitin at 10 mg L<sup>-1</sup> or the later tempering of the mangoes in the suspensions of *R. glutinis* Lv316 or *L. xyliniticus* AP282 presented an efficacy between 83 and 89% in the control of anthracnose originated from the quiescent *C. gloeosporioides* infections, alternatives which may be considered in the postharvest treatment of the mango cv. Azúcar.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia and the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA for funding the project “Evaluation of prevention methods and tools to prevent anthracnose on the field and postharvest (First approach)” that allowed this research to be carried out.

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

- <https://www.agronegocios.co/agricultura/productores-de-mango-del-magdalena-recibieron-luz-verde-para-exportar-hacia-europa-3146069>. (Consulta, marzo 2021).
- Ban Z, Wei W, Yang X, Feng J, Guan J and Li L. 2015. Combination of heat treatment and chitosan coating to improve postharvest quality of wolfberry (*Lycium barbarum*). *International Journal of Food Science and Technology* 50(4): 1019–1025. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12734>
- Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-Del Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E and Wilson CL. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25(2): 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>
- Bautista-Rosales P, Calderon-Santoyo M, Servín-Villegas R, Ochoa-Álvarez N, Vázquez-Juárez R and Ragazzo-Sánchez J. 2014. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococ-*

- cus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. Crop Protection (65): 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.019>
- Calvente V, Benuzzi D and de Tosetti M. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. International Biodeterioration and Biodegradation 43(4): 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00046-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00046-3)
- Chechi A, Stahlecker J, Dowling ME and Schnabel G. 2019. Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. Pesticide Biochemistry and Physiology (158): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.002>
- Corrales-Bernal A, Maldonado ME, Urango LA, Franco MC and Rojano BA. 2014. Mango de azúcar (*Mangifera indica*), variedad de Colombia: características antioxidantes, nutricionales y sensoriales. Revista chilena de nutrición 41(3): 312–318. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000300013>
- Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Muy-Rangel MD, Sañudo-Barajas A, Márquez-Zequera I, Allende-Molar R. 2005. Control Biológico de Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su Efecto en la Calidad Poscosecha del Mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 24–32. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61223104.pdf>
- Corkidi G, Balderas-Ruiz KA, Taboada B, Serrano-Carreón L and Galindo E. 2006. Assessing mango anthracnose using a new three-dimensional image-analysis technique to quantify lesions on fruit. Plant Pathology 55(2): 250–257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01321.x>
- Díaz-García A, García-Riaño J and Zapata-Narváez J. 2015. Improvement of sporulation conditions of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in liquid fermentation. Advances in Bioscience and Biotechnology 6 (4): 302–310. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2015.64029>
- Fallik E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharvest Biology and Technology 32(2): 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.10.005>
- Fallik E, Grinberg S, Alkalai S and Lurie S. 1996. The effectiveness of postharvest hot water dipping on the control of grey and black moulds in sweet red pepper (*Capsicum annuum*). Plant Pathology 45(4): 644–649. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-175.x>
- Gámez RM, Rodríguez F, Bernal JF, Agarwala R, Landsman D and Mariño-Ramírez L. 2015. Genome sequence of the Banana plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* BS006. Genome announcements 3(6): e01391-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01391-15>
- Kamle M and Kumar P. 2016. *Colletotrichum gloeosporioides*: Pathogen of anthracnose disease in Mango (*Mangifera indica* L.). In: Kumar P, Kumar GV, Kumar TA and Kamle M (Ed.). Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices, Fungal Biology. 207–219. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_9
- Karabulut O and Baykal N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. Crop Protection 23(5): 431–435. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.09.012>
- Koller M, Rayns F, Cubison S and Schmutz U. 2016. Guidelines for Experimental Practice in Organic Greenhouse Horticulture. BioGreenhouse COST Action FA 1105. <http://dx.doi.org/10.18174/373581>
- Lastochkina O, Seifikalhor M, Aliniaiefard S, Baymiev A, Pusenkova L, Garipova S Kulabuhova D and Maksimov I. 2019. *Bacillus* spp: Efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. Plants 8(4): 97. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>
- Lucas-Bautista JA, Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI y Gómez-Ramírez M. 2019. Determinación de quitina en hongos poscosecha y de quitinasas en frutos de papaya "Maradol". Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 1-7. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1902-3>
- Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S and Liu Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. International Journal of Food Microbiology 167(2): 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- MINAGRICULTURA. 2018. Mango. https://www.agronet.gov.co/Documents/13-MANGO_2017.pdf (Consulta diciembre, 2020).
- Moreno CA, Zapata JA, Díaz A and Cotes AM. 2012. Selection of a *Pichia onychis* isolate for biological control of *Botrytis cinerea* based on its eco-physiological characteristics. IOBC-WPRS Bulletin 78(2):229-233.
- Naureen Z, Rehman NU, Hussain H, Hussain J, Gilani SA, Al Housni SK, Mabood F, Khan AL, Farooq S, Abbas G and Harrasi AA. 2017. Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. Frontiers in Microbiology (8):1477. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01477>
- Perez M, Contreras L, Garnica N, Fernández-Zenoff M, Farias M, Sepulveda M, Ramallo J and Dib J. 2016. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. PLoS ONE 11(10): 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165590>
- Prusky D, Alkan N, Mengiste T and Fluhr R. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. Annual Review of Phytopathology 51(1): 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349>
- Rungjindamai N. 2016. Isolation and evaluation of biocontrol agents in controlling anthracnose disease of mango in Thailand. Journal of Plant Protection Research 56(3): 306–311. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0034>
- Schirra M, D'hallewin G, Ben-yehoshua S and Fallik E. 2000. Host-pathogen interaction modulated by heat treatment. Postharvest Biology and Technology 21(1): 71–85. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00166-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00166-6)
- Trinidad-Angel E, Ascencio-Valle FDJ, Ulloa OA, Ramírez-Ramírez OC, Ragazzo-Sánchez JA, Calderón-Santoyo M and Bautista PU. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (19):3953-3964. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>
- Usall J, Ippolito A, Sisquella M and Neri F. 2016. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Postharvest Biology and Technology (122): 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.002>

- Vilaplana R, Pazmiño L and Valencia-Chamorro S. 2018. Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. *Postharvest Biology and Technology* (138): 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.008>
- Zapata J, Acosta C, Díaz A, Villamizar L and Cotes AM. 2011. Characterization of *Rhodotorula glutinis* and *Pichia onychis* isolates with potential as biopesticides for controlling *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae* (905): 155–160. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.905.16>
- Zapata J and Cotes AM. 2013. Eficacia de dos prototipos de bioplaguicida a base de *Rhodotorula glutinis* cepa LvCo7 y un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003 en el control de *B. cinerea* en cultivos de mora. Pp. 73–79. *En*: Zapata, J. (Ed.), Desarrollo de prototipos de bioplaguicida a base de *Rhodotorula glutinis* LvCo7 para el control de *Botrytis cinerea* en cultivos de mora. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Produmedios 79p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13072>
- Zhang H, Komla G, Castoria R, Tibiru M and Yang Q. 2017. Augmentation of biocontrol agents with physical methods against postharvest diseases of fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* (69): 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.020>
- Zhang H, Ma L, Turner M, Xu H, Zheng X, Dong Y and Jiang S. 2010. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* against postharvest Rhizopus rot of strawberries and the possible mechanisms involved. *Food Chemistry* 122(3): 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.013>
- Zhang H, Wang L, Dong Y, Jiang S, Zhang H and Zheng X. 2008. Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *International Journal of Food Microbiology* 126(1–2): 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.018>

Identification and molecular analysis of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from tomato in Baja California, Mexico

Identificación y análisis molecular de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* aisladas de jitomate en Baja California, México

Sara Elodia Armenta-López, Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte, Lázaro Cárdenas 315 Pte. Col. Centro, Los Mochis, Sinaloa; Cesar Valenzuela-Solano, Sitio Experimental Costa de Ensenada- INIFAP. Calle del Puerto Núm. 375-23 Fracc. Playa Eda. Ensenada, B. C. 22880; Rufina Hernández-Martínez*, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Carretera Ensenada-Tijuana 3918, Zona Playitas, 22860 Ensenada, B.C. Autora de Correspondencia: ruhernan@cicese.mx

Recibido: 04 de Marzo, 2021.

Aceptado: 23 de Abril, 2021.

Armenta-López SE, Valenzuela-Solano C and Hernández-Martínez R. 2021. Identification and molecular analysis of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from tomato in Baja California, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 266-288.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2103-4>

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 29, 2021.

Resumen. Baja California es uno de los principales productores de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en México. La marchitez vascular, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo del jitomate en el estado de Baja California; sin embargo, se desconoce la identidad de las especies de *Fusarium*, la ocurrencia de *Fol* y las razas

Abstract. In Baja California, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is the causal agent of vascular wilt of tomato; however, the races present in the state remain unknown. The objective of this work was to isolate and identify *Fusarium* spp. and to validate a multiplex-PCR system to identify strains *Fol* and at the race level. Sixty symptomatic plants were collected, of which 45 isolates were obtained. When analyzed microscopically, it was confirmed that 44 corresponded to *Fusarium* spp. The use of the sp13 and sp23 oligonucleotide pairs that amplified the *pgx4* and *pg1* polygalacturonase genes, respectively, indicated the presence of *Fol* races 1 and 3 in the area. Sequence analysis of the elongation factor of the 1 α translation (TEF1- α) of representative strains served to confirm its identity and the presence of *Fol* and *F. solani* in tomato plants with symptoms of vascular wilt. Finally, a RAPD analysis showed that the oligonucleotide OPA-11, generates a specific banding pattern in

presentes. El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar aislados de *Fusarium* de plantas enfermas de jitomate y validar métodos de diagnóstico para identificar *Fol* a nivel de raza. Se colectaron 60 plantas sintomáticas, de las que se obtuvieron 45 aislados. Al ser analizadas microscópicamente se confirmó que 44 pertenecieron al género *Fusarium*. El uso de los pares de oligonucleótidos sp13 y sp23, que amplifican los genes de poligalacturonasas *pgx4* y *pgl*, indicaron la presencia de *Fol* razas 1 y 3 en la zona. El análisis de secuencias del factor de elongación de la traducción 1 α (TEF1- α) de cepas representativas confirmó la identificación de la presencia de *Fol* y de *Fusarium solani* en plantas de jitomate con síntomas de marchitez vascular. Finalmente, un análisis RAPD, identificó que el oligonucleótido OPA-11 genera un patrón de bandedo específico en aislados de la raza 1 por lo que podría emplearse como una forma rápida para la identificación de cepas de esta raza.

Palabras clave: polimorfismos de ADN, xilema, enfermedad vascular, hongos

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo de gran importancia económica en muchos países. México ocupa el segundo lugar con una producción de 2,923,163 t, en una superficie de 47,151 ha (SIAP, 2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) es el agente causal de la marchitez vascular del jitomate. Actualmente, se conocen tres razas fisiológicas de *Fol* que difieren en su grado de virulencia (Biju *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018). Para su detección se han utilizado distintas técnicas, como métodos moleculares (Chang *et al.*, 2018; Murugan *et al.*, 2020) y variedades diferenciales de jitomate con distintos genes de resistencia a cada una de las razas (Cai *et al.*, 2003; Pirayesh *et al.*, 2018), y la comparación de secuencias

Fol race 1, so it could be used as a quick way to identify them.

Key words: DNA Polymorphisms, xylem, vascular disease, fungi

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is a crop of great economic importance in many countries. Mexico is its second largest producer, with 2,923,163 t on a surface of 47,151 ha (SIAP, 2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is the causal agent of vascular wilting in tomato. Three physiological races of *Fol* are currently known, which vary in their degree of virulence (Biju *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018). Different techniques have been used to detect them, such as molecular methods (Chang *et al.*, 2018; Murugan *et al.*, 2020), along with different varieties of tomatoes with different genes for resistance to each of the races (Cai *et al.*, 2003; Pirayesh *et al.*, 2018) and the comparison of nucleotide sequences of the polygalacturonase genes (Kawabe *et al.*, 2005; Murugan *et al.*, 2020). These enzymes degrade polygalacturonic acid and are found in all of the organs of the plant, as well as in the cell walls of the tomato fruit, and they act as pectin depolymerizers. They therefore help invade and colonize host tissues (Martel *et al.*, 1998). Hirano and Arie (2006) compared the partial nucleotide sequences of an endopolygalacturonase gene (*pgl*) and an exopolygalacturonase gene (*pgx4*) of the special forms of (ff. spp.) *lycopersici* and *radicis-lycopersici* (which causes the rotting of the tomato crown), and designed the pairs of oligonucleotides (sp13 y sp23), based on Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), which, combined, help distinguish the *Fol* races.

In Mexico, races 1, 2 and 3 of *Fol* have been reported in the state of Sinaloa (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996; Carrillo *et al.*, 2003; Ascencio-Álvarez

nucleotídicas de los genes de poligalacturonasas (Kawabe *et al.*, 2005; Murugan *et al.*, 2020). Estas enzimas son degradadoras de ácido poligalacturónico, presente en todos los órganos de la planta y de la pared celular del fruto del jitomate, y actúan como depolimerizadoras de pectina, por lo que facilitan la invasión y colonización de tejido del hospedero (Martel *et al.*, 1998). Hirano y Arie (2006) compararon las secuencias nucleotídicas parciales de un gen de endopoligalacturonasa (*pgl1*) y otro de una exopoligalacturonasa (*pgx4*) de las formas especiales (ff. spp.) *lycopersici* y *radicis-lycopersici* (causante de la pudrición de la corona del jitomate) con las que diseñaron los pares de oligonucleótidos (sp13 y sp23), basados en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms), que en conjunto permiten diferenciar las razas de *Fol*.

En México, se ha reportado la presencia de las razas 1, 2 y 3 de *Fol* en el estado de Sinaloa (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996; Carrillo *et al.*, 2003; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008), las razas 2 y 3 en Baja California Sur (Holguín-Peña, 2005) y las razas 2 y 3 en San Luis Potosí (Hernández *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha reportado la presencia de *Fusarium circinatum* y *Fusarium andiyazi* ocasionando marchitez en jitomate en los estados de Morelos, Puebla y Tlaxcala (Isaac *et al.*, 2018). En Baja California, se conoce de la presencia de *Fusarium* en jitomate, pero no se han identificado las especies. La correcta identificación de las variantes patogénicas de *Fusarium* presentes en una determinada zona de cultivo, es indispensable para establecer la utilización de cultivares. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar especies de *Fusarium* asociadas a plantas de jitomate con síntomas de marchitez vascular en Baja California, México y al mismo tiempo validar un método molecular para diferenciarlos.

et al., 2008), races 2 and 3 in Baja California Sur (Holguín-Peña, 2005), and races 2 and 3 in San Luis Potosí (Hernández *et al.*, 2014). Additionally, the presence of *Fusarium circinatum* and *Fusarium andiyazi* have been reported to cause wilting in tomatoes in the states of Morelos, Puebla and Tlaxcala (Isaac *et al.*, 2018). In Baja California, the presence of *Fusarium* is known in tomato, although the species have not yet been identified. The correct identification of the pathogenic variants of *Fusarium* found in a particular cultivation area is crucial to establish the use of cultivars. The aim of this investigation was to isolate and characterize *Fusarium* species related to tomato plants with vascular wilt symptoms in Baja California, Mexico, as well as to validate a molecular method to differentiate them.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples, isolation and morphologic characterization of strains

Tomato plants with symptoms of vascular wilt were gathered from four locations: two from the town of Maneadero and two from the town of San Quintín, in the municipal area of Ensenada, Baja California. In total, 60 tomato plants were collected, with different levels of vascular wilt symptoms. Five samples of the Cherry variety were taken from San Quintín Este, from an open-air plantation. Ten plants established in bags were taken from a greenhouse in San Quintín Norte, five of which were Cherry Zebra and five, Strawberry tomatoes. From Maneadero Sur, three greenhouses with plants grown in the soil were sampled; two Cherry tomato plants were taken from the first one, along with three Heirloom tomato plants. From the

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras, aislamiento y caracterización morfológica de cepas

Se colectaron plantas de jitomate con síntomas de marchitez vascular en cuatro sitios, dos del poblado de Maneadero y dos del poblado de San Quintín del municipio de Ensenada, Baja California. En total, se colectaron 60 plantas de jitomate con diferentes niveles de síntomas de marchitez vascular. De San Quintín Este, se obtuvieron cinco muestras de la variedad tipo Cherry de un cultivo establecido a cielo abierto. De San Quintín Norte, se obtuvieron diez plantas de cultivo en invernadero establecidos en bolsas, cinco tipo Cherry Zebra y cinco tipo Fresa. De Maneadero Sur, se muestrearon tres invernaderos con cultivos establecidos en suelo, en el primero se tomaron dos plantas del tipo Cherry y tres del tipo Heirloom; en el segundo, cinco muestras del tipo Heirloom, y en el tercero cinco muestras, una de la variedad G5, tres de la variedad RG-871 y una de la variedad TC. Finalmente, en Maneadero Norte se tomaron muestras de 30 plantas tipo Cherry establecidos a cielo abierto.

Las muestras previamente etiquetadas, fueron depositadas en bolsas de polietileno e inmediatamente trasladadas al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) para su procesamiento. Las plantas se lavaron con agua corriente, se secaron con toallas de papel y en el tallo, a aproximadamente 10 cm de altura de la corona se realizaron tres cortes transversales y se obtuvieron trozos de tejido sintomático. Se sumergieron en alcohol al 75% y se flamearon rápidamente. Posteriormente, con la ayuda de una navaja esterilizada al calor, se cortaron rebanadas de alrededor de 0.5 cm y se colocaron sobre medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA), suplementado con cloranfenicol

second one, five Hierloom samples were taken, and in the third one, five G5 samples, three of the RG-871 variety and one TC. Finally, in Maneadero Norte, 20 samples were taken of Cherry tomato plants grown in the open field.

The samples were labelled and placed in polyethylene bags and moved to the Phytopathology Laboratory of the Scientific Research and Higher Education Center of Ensenada (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, CICESE) for processing. The plants were washed with tap water, dried with paper towels and, on the stem, approximately 10 cm above the root crown, three cross sectional cuts were made and pieces of symptomatic tissue were taken. They were submerged in alcohol at 75% and quickly flamed. Later, using a heat-sterilized blade, 0.5 cm pieces were cut and placed in a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, supplementing with chloramphenicol ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$), and the Petri dishes were incubated in the dark at $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. To obtain the pure cultures from the fungal growth found, seven days after harvesting, hyphae tips were transferred into a PDA medium and their putative identification was carried out using morphological observation. From those primary plantations, monosporic strains were obtained, which were kept in glycerol at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until their use.

The fungal isolates were grown in PDA and agar-carnation (CLA) (Fisher *et al.*, 1982), two of the standard media used to identify *Fusarium* species (Leslie and Summerell, 2008). The Petri dishes were stored at $27 \text{ }^\circ\text{C}$ in complete darkness, following recommendations for their identification. After 15 days, the morphology and pigmentation of the culture in PDA were analyzed, along with the production of sporodochia, sclerotia, reproductive structures and macroconidia in a CLA medium using an Olympus SZX12 stereoscopic microscope and an Axiovert 200 Zeiss® inverted microscope.

(15 µg mL⁻¹) y las cajas se incubaron en la oscuridad a 25 ± 2 °C. Para la obtención de cultivos puros del crecimiento fúngico observado, alrededor de siete días después de la siembra, se transfirieron puntas de hifas a medio PDA y su identidad putativa se hizo por observación morfológica. A partir de éstos cultivos primarios se obtuvieron cepas monospóricas, que se mantuvieron en glicerol a -20 °C hasta su utilización.

Los aislamientos fúngicos se cultivaron en PDA y agar-clavel (CLA) (Fisher *et al.*, 1982), dos de los medios estándar utilizados en la identificación de las especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2008). Las cajas se mantuvieron a 27 °C en total oscuridad, de acuerdo a lo recomendado para su identificación. Después de 15 días se analizó la morfología y pigmentación de la colonia en PDA y la producción de esporodoquios, esclerocios, las estructuras de reproducción y las macroconidias en medio CLA usando un microscopio estereoscópico Olympus SZX12 y un microscopio invertido Axiovert 200 Zeiss®.

Caracterización molecular de razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para la extracción de ADN, las cepas se cultivaron en papa dextrosa líquido en agitación a 27 °C durante cuatro días. El micelio se recuperó por filtración, se congeló y liofilizó en tubos de microcentrifuga de 2 ml y se pulverizó usando varillas de vidrio de punta aguzada. El ADN genómico se obtuvo empleando el método de CTAB al 3% y al final se ajustó a 50 µg mL⁻¹.

Para la identificación de las razas de *Fol* se mezclaron dos pares de oligonucleótidos reportados previamente (Hirano y Arie, 2006) para realizar un PCR múltiple. El par sp13-f (5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3') y sp13-r (5'-TCCTTGACACATCACAGAG-3') amplifican un fragmento de

Molecular characterization of races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

For the extraction of DNA, the strains were grown in a potato dextrose liquid, shaking at 27 °C for four days. The mycelium was recovered by filtration, frozen and lyophilized in 2 ml microcentrifuge tubes, and pulverized using glass rods with pointed tips. The genomic DNA was obtained using the CTAB method at 3% and finally, it was adjusted to 50 µg mL⁻¹.

To identify the races of *Fol*, two pairs of previously reported oligonucleotides (Hirano and Arie, 2006) were mixed to carry out a multiplex PCR. The sp13-f (5'-GTCA GTCCATTGGCTCTCTC-3') and sp13-r (5'-TCCTTGACACATCACAGAG-3') pair amplify a 445 pb fragment of the gene of one exopolygalacturonase (*pgx4*) in races 1 and 3, but not in race 2; the pair of sp23-f (5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3') and sp23-r (5'-GCAACAGGTCGTGGGGAAAA-3') was designed in the site of deletion of two nucleotides (nt 259-260) in the gene of an endopolygalacturonase (*pg1*) and it amplifies a fragment of 518 pb in races 2 and 3, but not in race 1. In the isolates of *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, these oligonucleotides did not amplify any fragments (Hirano and Arie, 2006). After testing several conditions of amplification by combining the oligonucleotides, the reaction mixture used consisted of 1X buffer (Axygen), 0.2 µg mL⁻¹ de BSA, 0.2 mM of dNTPs, 2.5 mM of MgCl₂, 0.4 µM of each of the four oligonucleotides, 0.1 U µg⁻¹ of Taq polymerase (5 U, Axygen) and 50 ng of DNA in a final volume of 25 µL. Amplification consisted of a 94 °C cycle for 1 min, followed by 45 cycles at 94 °C for 1 min, 61 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min, using a BioRad T100 thermocycler. The products were evaluated by electrophoresis in agarose gel at 1% and photo-

445 pb del gen de una exopoligalacturonasa (*pgx4*) en las razas 1 y 3 pero no en la raza 2; el par sp23-f (5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3') y sp23-r (5'-GCAACAGGTCGTGGGGAAAA-3') fue diseñado en el sitio de delección de dos nucleótidos (nt 259-260) en el gen de una endopoligalacturonasa (*pg1*) y amplifica un fragmento de 518 pb en las razas 2 y 3, pero no en la raza 1. En los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* estos oligonucleótidos no amplifican ningún fragmento (Hirano y Arie, 2006). Después de probar varias condiciones de amplificación combinado los oligonucleótidos, la mezcla de reacción usada consistió en 1X buffer (Axygen), 0.2 µg mL⁻¹ de BSA, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 0.4 µM de cada uno de los cuatro oligonucleótidos, 0.1 U µg⁻¹ de Taq polimerasa (5 U, Axxygen) y 50 ng de ADN en un volumen final de 25 µL. La amplificación consistió en un ciclo de 94 °C por 1 min, seguido de 45 ciclos de 94 °C por 1 min, 61 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min, usando un termociclador BioRad T100. Los productos se evaluaron en electroforesis en gel de agarosa al 1% y se fotografiaron utilizando un fotodocumentador Quantity One de BioRad. El control positivo fue ADN extraído de *Fol* raza 1 y *Fol* raza 2, proporcionadas amablemente por el Dr. Raymundo García del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD), unidad Culiacán.

Una vez analizados los productos de PCR, y para confirmar que el fragmento amplificado correspondía a la secuencia esperada, se seleccionaron al azar cinco aislados de las razas determinadas. Los productos amplificados seleccionados se cortaron del gel y se purificaron utilizando el kit DNA clean y concentrator (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante y los fragmentos generados fueron enviados a secuenciar a Eton Bioscience Inc. (San Diego, California). Una vez obtenidas las secuencias, éstas se compararon

grahed using a BioRad Quantity One photodocumenter. The positive control was DNA taken from race 1 *Fol* and race 2 *Fol*, kindly provided by Dr. Raymundo García of the Food Research and Development Center (Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, CIAD), Culiacán.

After analyzing the PCR products, and to confirm that the amplified fragment matched the expected sequence, five isolates were chosen at random from the determined races. The amplified products were cut out of the gel and purified using the DNA Clean and Concentrator kit (Zymo Research), following the instructions by the manufacturer and the fragments generated were sent for sequencing to Eton Bioscience Inc. (San Diego, California). Once the sequences were obtained, they were compared using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sequences from the fragments of *pgx4* and *pg1* were recovered and they were all aligned using the program BioEdit v7.2.3 (copyright (c) 1997-2013, Tom Hall).

To confirm that the isolates obtained and analyzed with the multiplex PCR were from *F. oxysporum*, some of them were selected and a fragment of approximately 700 pb from the TEF1- α region was amplified by PCR, using oligonucleotides EF-1 and EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998), used earlier to distinguish between species of *Fusarium* (Lievens *et al.*, 2009). The reaction of the PCR was similar to the one used to amplify the polygalacturonase genes, but the concentration was reduced to 1.5 mM of MgCl₂. The amplification consisted of an initial denaturalization of 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 61.5 °C, 1 min at 72 °C and a final extension of 10 min at 72 °C. The fragments were evaluated by electrophoresis in agarose gel, purified and sequenced as described earlier. For the comparative analysis of the sequences, we accessed the Fusarium-ID (<http://>

utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se recuperaron secuencias de los fragmentos de *pgx4* y *pgl* y todas se alinearon utilizando el programa BioEdit v7.2.3 (copyright (c) 1997-2013, Tom Hall).

Para confirmar que los aislados obtenidos y analizados con la PCR múltiple pertenecían a *F. oxysporum*, se seleccionaron algunos de ellos y se amplificó por PCR un fragmento de alrededor de 700 pb de la región del TEF1- α , usando los oligonucleótidos EF-1 y EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998). Usados anteriormente para diferenciar entre especies de *Fusarium* (Lievens *et al.*, 2009). La reacción de PCR fue similar a la usada para amplificar los genes de poligalacturonasas, excepto que se disminuyó la concentración a 1.5 mM de MgCl₂. La amplificación constó de una desnaturalización inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 61.5 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los fragmentos se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron y secuenciaron como se describió de manera previa. Para el análisis comparativo de las secuencias, se accedió al banco de datos Fusarium-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) y al del NCBI, usando el algoritmo de BLAST. Algunas secuencias que mostraron máxima similitud con las obtenidas en este trabajo se obtuvieron del banco de datos, y todas se alinearon usando el programa BioEdit v7.2.3. Finalmente, se obtuvo el filograma utilizando el programa MEGAX (Kumar *et al.*, 2018).

Identificación de razas de *Fol* con el uso de variedades diferenciales

Para confirmar la identificación de las razas determinadas por PCR múltiple, se utilizaron cuatro genotipos de jitomate; Bonny Best (sin resistencia), Manapal (resistente a *Fol* raza 1), Walter (resistente

isolate.fusariumdb.org) and NCBI databanks, using the BLAST algorithm. Some sequences that showed the maximum similarity with those obtained in this work were recovered from the genebank, and they were all aligned using the program BioEdit v7.2.3. Finally, the phylogram was obtained using the program MEGAX (Kumar *et al.*, 2018).

Identification of races of *Fol* with the use of differential varieties

Four tomato genotypes were used to confirm the identity of the races determined by multiplex PCR: Bonny Best (without resistance), Manapal (resistant to *Fol* race 1), Walter (resistant to *Fol* race 2) and I₃R₃ (resistant to *Fol* race 3) (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008).

Seeds of each variety were planted in polyethylene trays with 72 pits in a 2:1 mixture of Peat moss-perlite and after 30 days, they were transplanted into 1 L polyethylene pots. Twenty-one days after transplanting, six plants of each variety were inoculated with one out of five of the isolates selected (the same ones used in the sequencing analysis), adding 10 mL of a suspension of 1X10⁷ conidia mL⁻¹ two centimeters from the stem (Baysal *et al.*, 2009). *Fol* strain races 1 and 2 were used as positive controls and the negative control consisted of 10 mL of water. The plants were kept under greenhouse conditions at a variable temperature of 36±16 °C, distributed in a completely random design. Damages were evaluated on a daily basis until the observation of symptoms in the control strains (approximately 15 days after inoculation), based on the arbitrary damage scale proposed previously (Vakalounakis and Fragkiadakis, 1999), where: 0 = plant without symptoms, 1 = plant with slight wilting or similar to a lack of water, 2 = plant similar to scale 1 + yellow or dry leaves in 50% of the foliage, 3 = plant similar to scale 1 + yellow or

Fol raza 2) e I₃R₃ (resistente a *Fol* raza 3) (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008).

Las semillas de cada variedad, se sembraron en charolas de polietileno de 72 cavidades en una mezcla 2:1 de Peat moss-perlita. Después de 30 días, se trasplantaron en macetas de polietileno de 1 L. A los 21 días del trasplante, seis plantas de cada variedad se inocularon con uno de cinco aislados seleccionados (los mismos usados en el análisis de secuenciación), agregando 10 mL de una suspensión de 1×10^{-7} conidios mL⁻¹ a dos centímetros del tallo (Baysal *et al.*, 2009). Como controles positivos se usaron las cepas *Fol* razas 1 y 2 y como control negativo 10 mL de agua. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero a temperatura variable 36 ± 16 °C, distribuidas en un diseño completamente al azar. La evaluación de daños se realizó diario hasta la observación de síntomas en las cepas control (aproximadamente 15 días después de la inoculación), basándose en la escala arbitraria de daño propuesta previamente (Vakalounakis y Fragkiadakis, 1999), donde: 0 = planta sin síntomas, 1 = planta con marchitez leve o similar a la falta de agua, 2 = planta similar a grado 1 + hojas amarillas o secas, en menos del 50% del follaje, 3 = planta similar a escala 1 + hojas amarillas o secas en un 50% o más del follaje y 4 = plantas completamente marchitas. Cada una de las escalas representa los siguientes porcentajes de daño (0%, 25%, 50%, 75% y 100%). Las plantas que presentaron un porcentaje de marchitez vascular del 20% o menos fueron catalogadas como resistentes a las cepas inoculadas.

Evaluación de la variabilidad genética de *Fusarium* spp. por polimorfismos de ADN amplificados al azar

Para determinar la variabilidad inter e intra-específica entre los aislados, se utilizó la técnica

dry leaves in 50% or more of the foliage and 4 = plant completely wilted. Each one of these scales represents the percentages of damage of 0%, 25%, 50%, 75% and 100%, respectively. The plants that displayed a percentage of vascular wilting of 20% or less were considered resistant to the strains inoculated.

Evaluation of the genetic variability of *Fusarium* spp. by randomly amplified DNA polymorphisms

To determine the inter and intraspecific variability between the isolates, we used the RAPD, or Random Amplified Polymorphic DNA technique (Assigbetse *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2001; Luna-Paez *et al.*, 2004). The size and number of fragments generated in strains of *Fol* race 1 and *Fol* race 2 were determined by using the universal oligonucleotides OPA-01 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3'), OPA-05 (5'-AGGGTCTTG-3'), OPA-11 (5'-CAATCGCCGT-3'), OPA-15 (5'-TTCCGAACCC-3'), OPA-16 (5'-AGCCAGCGAA-3') and OPA-17 (5'-GACC-GCTTGT-3') (Operon Technologies Inc). The reaction mixture consisted of 0.75 mM of Taq master Mix (Mercury, Cat# 790005), 25 ng of DNA and 0.1 mM of one of the oligonucleotides in a final volume of 25 µL. The conditions for amplification were 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for one min, 36 °C for 1 min and 72 °C for 1.5 min, with a final extension of 10 min at 72 °C. The amplified fragments were analyzed in 1.5% agarose gels and their size was determined using the program Quantity one (1D- Analysis Software), with a 100bp molecular weight marker as a reference. Based on the results, the oligonucleotides selected were those which displayed different striping patterns to the amplicons obtained for each race, and they were used for the typing of the strains obtained in this study.

de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) (Assigbetse *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2001; Luna-Paez *et al.*, 2004). El tamaño y número de fragmentos generados en las cepas tipo *Fol* raza 1 y *Fol* raza 2, se determinó mediante el uso de los oligonucleótidos universales: OPA-01 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPA-03 (5'-AGTCAGC-CAC-3'), OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3'), OPA-11 (5'-CAATCGCCGT -3'), OPA-15 (5'-TTCC-GAACCC-3'), OPA16 (5'-AGCCAGCGAA-3'), y OPA 17 (5'-GACCGCTTGT-3') (Operon Technologies Inc). La mezcla de reacción consistió en 0.75 mM de Taq master Mix (Mercury, Cat# 790005), 25 ng de ADN y 0.1 mM de uno de los oligonucleótidos en un volumen final de 25 µL. Las condiciones para la amplificación fueron, 94 °C por 2 min; seguida de 35 ciclos de 94 °C por un min; 36 °C por 1 min y 72 °C por 1.5 min, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1.5% y su tamaño se determinó con el programa Quantity one (1D- Analysis Software) usando como referencia un marcador de peso molecular de 100 bp. Con base en los resultados, se eligieron los oligonucleótidos que mostraron patrones diferentes de bandeo de los amplicones obtenidos de cada raza y se usaron para la tipificación de las cepas obtenidas en este estudio.

RESULTADOS

En todas las plantas muestreadas se observó necrosis en los haces vasculares. De las 60 muestras colectadas, se obtuvieron 45 aislados, tres de San Quintín Este (RG-2, RG-3 y RG-4), tres de San Quintín Norte (RE-2, RE-3 y RE-4), nueve de Maneadero Sur SO-2, SO-4, SO-5, SO-7, SO-8, SO-9, SO-11, SO-13 y SO-15) y 30 de Maneadero Norte (Voip1 a Voip30) (Cuadro 1). Adicionalmente, de

RESULTS

Necrosis was observed in all vascular bundles. Out of the 60 samples gathered, 45 isolates were obtained, three of which were taken from San Quintín Este (RG-2, RG-3 and RG-4), three from San Quintín Norte (RE-2, RE-3 and RE-4), nine from Maneadero Sur SO-2, SO-4, SO-5, SO-7, SO-8, SO-9, SO-11, SO-13 and SO-15) and 30 from Maneadero Norte (Voip1 to Voip30) (Table 1). Additionally, microorganisms different to *F. oxysporum*, including *Botrytis* sp., *Penicillium* sp. and bacteria were isolated from 15 plants. In five symptomatic plants sampled in area II, the wilt observed was considered to be caused by bacteria. All isolates different to *Fusarium* spp. were discarded.

Morphological characterization of fungal isolates

In PDA medium, the isolates displayed four types of colony morphology, named A, B, C and D in this investigation. The isolates in group A (Voip-1 to Voip-5) presented white cottonlike mycelia, irregularly shaped, with a violet center in the top and bottom (Figure 1A). The isolates from group B (Voip2 to Voip4, Voip7, Voip10, Voip12, Voip13, Voip23, Voip25, Voip26 and Voip28), presented cottonlike mycelia, a filamentous edge with a faint violet color and the presence of yellow or colorless sporodochia (Figure 1B and 1E). The isolates from group C (RG-2, RG-4, RE-2, RE-4, SO-4, SO-5, SO-8, SO-9, SO-11, SO-13, Voip6, Voip8, Voip9, Voip11, Voip14 to Voip22, Voip24 and Voip27) presented abundant cottonlike mycelia with a filamentous shape and a circular edge with a faint violet color at the top and white to violet at the bottom (Figure 1C). Finally, the isolates in group D (RG-3, RE-3, SO-2, SO-7 and SO-15) presented

Cuadro 1. Identificación de los aislamientos obtenidos de plantas de jitomate de distintos varietales en cuatro áreas muestreadas.
Table 1. Identification of the isolates obtained from tomato plants from different varietals in four sampled areas.

| Área | ID muestra | Variedad | Sistema |
|-------------------|------------------|--------------|------------------------------------|
| San Quintín Este | RG-2 | Cherry | Suelo/fertirrigación |
| San Quintín Este | RG-3 | Cherry | Suelo/fertirrigación |
| San Quintín Este | RG-4 | Cherry | Suelo/fertirrigación |
| San Quintín Norte | RE-2 | Cherry zebra | Bolsa/musgo de turba y vermiculita |
| San Quintín Norte | RE-3 | Cherry zebra | Bolsa/musgo de turba y vermiculita |
| San Quintín Norte | RE-4 | Cherry zebra | Bolsa/musgo de turba y vermiculita |
| Maneadero Sur | SO-2 | Cherry | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-4 | Cherry | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-5 | Heirloom | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-7 | Heirloom | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-8 | Heirloom | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-9 | Heirloom | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-11 | Heirloom | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-13 | Heirloom | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Sur | SO-15 | RG-871 | Suelo/fertirrigación |
| Maneadero Norte | Voip-1 a Voip-30 | Cherry | Suelo/fertirrigación |

15 plantas se aislaron microorganismos diferentes a *F. oxysporum*, incluidos *Botrytis* sp., *Penicillium* sp. y bacterias. En cinco plantas sintomáticas muestreadas en el San Quintín Norte, se considera que la marchitez observada fue ocasionada por bacterias. Todos los aislados diferentes a *Fusarium* spp. fueron descartados.

Caracterización morfológica de los aislados fúngicos

En medio PDA, los aislados mostraron cuatro tipos de morfología colonial, aquí denominados A, B, C y D. Los aislados en el grupo A (Voip-1 a Voip-5) presentaron micelio algodonoso, forma irregular con coloración blanca y centro violeta en el anverso y reverso (Figura 1A). Los aislados del grupo B (Voip2 a Voip4, Voip7, Voip10, Voip12, Voip13, Voip23, Voip25, Voip26 y Voip28), presentaron micelio algodonoso, borde filamentoso con coloración violeta tenue y la presencia de esporodocios

cottonlike mycelia, a filamentous shape and edges, with white to cream color at the top and cream colored at the bottom, and the presence of yellow or colorless sporodochia and structures that seemed similar to sclerotia (Figure 1D and 1F).

In the CLA culture medium, with the exception of isolate SO-7, they all presented typical *F. oxysporum* structures (Leslie and Summerell, 2008), including macroconidia (Figures 1G and 1K), microconidia (Figure 1G), monophyllids (Figura 1M), conidiogenic structures (Figure 1L-1O) and false heads (Figures 1L-1O).

Molecular identification of races of *Fol*

The fragments generated by multiplex PCR using the pairs of oligonucleotides sp13 and sp23, indicated the presence of *Fol* race 1 and *Fol* race 3 in Baja California. According to this analysis, 36 isolates out of a total of 45 corresponded to *Fol* race 1, found in the four areas sampled; seven to

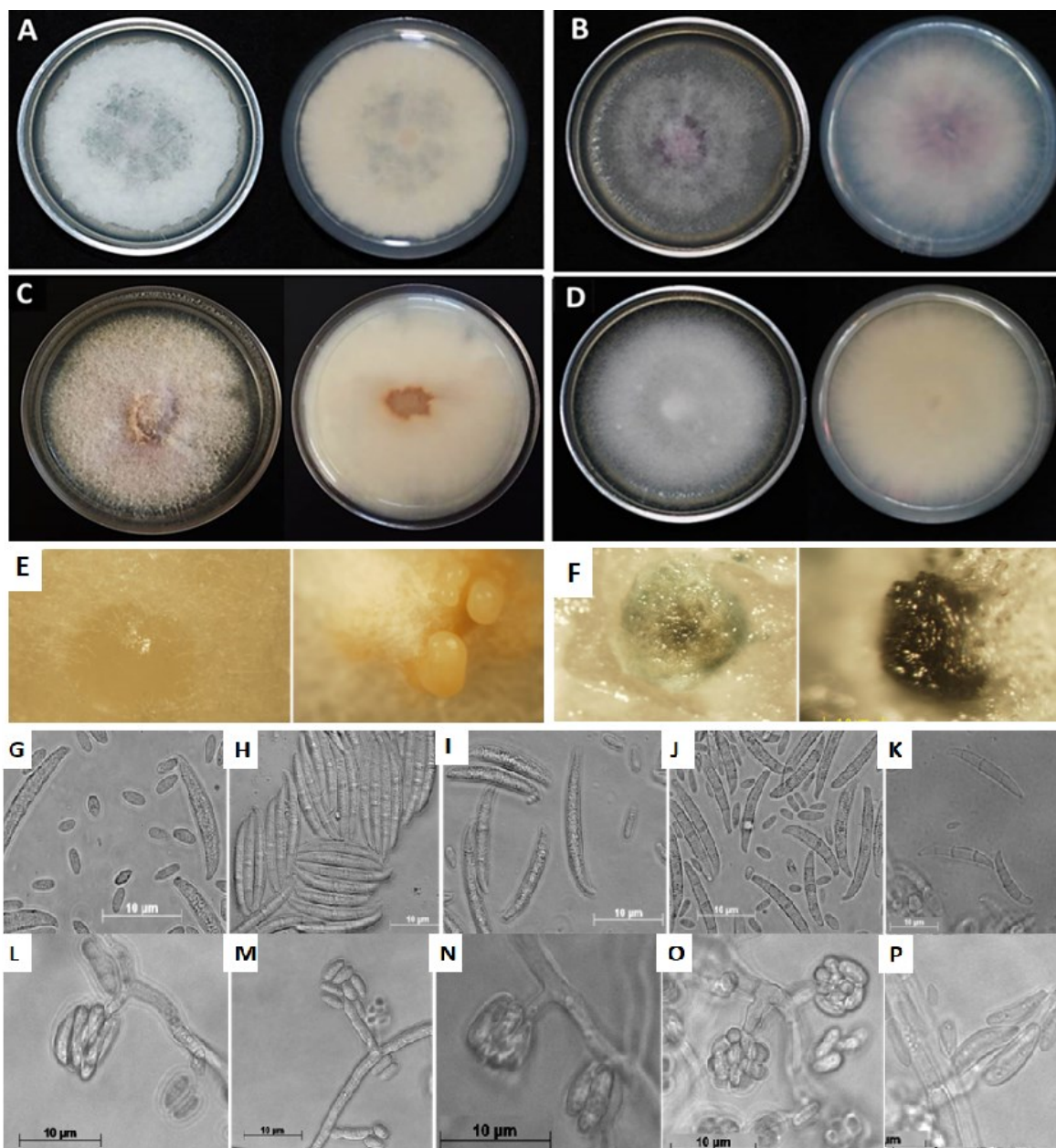


Figura 1. Características de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenidos de jitomate. Colonias de grupos representativos A) Voip5, B) Voip23, C) Voip14, D) SO-15. E) esporodocios, F) esclerocios observados en algunas colonias. Micrografías de macroconidios (G-K) y falsas cabezas (L-P) observados en los aislados de los cuatro grupos morfológicos de *Fusarium* y en *F. solani*. G y L) Voip5, H y M) Voip23, I y N) Voip14, J y O) SO-15 E K y P) SO-7.

Figure 1. Characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates obtained from tomato. Cultures of representative groups A) Voip5, B) Voip23, C) Voip14, D) SO-15. E) Sporodochia, F) sclerotia observed in some cultures. Micrographs of macroconidia (G-K) and false heads (L-P) observed in the isolates of the four *Fusarium* morphological groups and in *F. solani*. G and L) Voip5, H and M) Voip23, I and N) Voip14, J and O) SO-15 E K and P) SO-7.

amarillos o incoloros (Figura 1B y 1E). Los aislados del grupo C (RG-2, RG-4, RE-2, RE-4, SO-4, SO-5, SO-8, SO-9, SO-11, SO-13, Voip6, Voip8, Voip9, Voip11, Voip14 a Voip22, Voip24 y Voip27), presentaron micelio algodonoso abundante con forma filamentosa y borde circular con coloración violeta tenue en el anverso y blanco a ligeramente violeta en el reverso (Figura 1C). Finalmente, los aislados en el grupo D (RG-3, RE-3, SO-2, SO-7 y SO-15) presentaron micelio algodonoso, forma y bordes filamentosos con coloración blanca a crema en el anverso y crema en el reverso y la presencia de esporodocios amarillos o incoloros y estructuras semejantes a esclerocios (Figura 1D y 1F).

En medio de cultivo CLA, a excepción del aislado SO-7, todos presentaron estructuras características de *F. oxysporum* (Leslie y Summerell, 2008), entre otros: macroconidios (Figuras 1G - 1J), microconidios (Figura 1G), monofálides (Figura 1M), estructuras conidiógenas (falsas cabezas) (Figuras 1L a 1O).

Identificación molecular de razas de *Fol*

Los fragmentos generados por PCR múltiple usando los pares de oligonucleótidos sp13 y sp23, indicaron la presencia de *Fol* raza 1 y *Fol* raza 3 en Baja California. De acuerdo a este análisis, 36 aislados de un total de 45, correspondieron a *Fol* raza 1, presente en las cuatro áreas muestreadas; siete a *Fol* raza 3, y de los dos restantes (SO-2 y SO-11) no se amplificaron fragmentos con ninguno de los pares de oligonucleótidos utilizados (Figura 2).

Para comparar los resultados, se secuenciaron los fragmentos amplificados con el par de oligonucleótidos sp13 de *pgx4* de los aislados Voip4, Voip6, Voip8, Voip9 y Voip14, identificados como *Fol* raza 1 y los aislados RG-3, RE-2, SO-13 y SO-15, identificados como *Fol* raza 3. Al comparar las secuencias obtenidas de *pgx4* con la base de datos de

Fol race 3 and of the two remaining (SO-2 and SO-11) no fragments were amplified with any of the pairs of oligonucleotides used (Figure 2).

In order to compare results, the amplified fragments were sequenced with the pair of oligonucleotides sp13 of *pgx4* of isolates Voip4, Voip6, Voip8, Voip9 and Voip14, identified as *Fol* race 1 and isolates RG-3, RE-2, SO-13 and SO-15, identified as *Fol* race 3. When comparing the sequences obtained from *pgx4* with the NCBI database, all isolates displayed a similarity of 99% with sequence AB256797.1 (Hirano and Arie, 2006), which confirmed that they belonged to *Fol* race 1. Only in isolate SO-13 (race 3) were nucleotide polymorphisms found in positions 64 and 65 with sequence AB256797.1, with a G replacing A. On the other hand, the comparison of sequences of the fragments amplified with the pair of oligonucleotides sp23 of *pgl1* of the strains identified as race 3, RG-3, RE-2, SO-13 and SO-15 have a T instead of C in the nucleotide position 342 and do not present nucleotides A and T in sites 54 and 66, which would identify them as belonging to race 3 and they showed a similarity of 99% with sequence AB256794.1, which belongs to an isolate of *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* and with AB256778.1 of *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. RE-3, it displayed a G in site 342, differentiating from the rest of the isolates.

Amplification of the elongation factor (TEF1 α)

Based on the analysis of the multiplex PCR, the TEF1 α of the following isolates were amplified: Voip4, Voip6, Voip8, Voip9, Voip14, SO-7 (*Fol* race 1), RG-3, RE-2, SO-13, SO-15 (*Fol* race 3), SO-2 and SO-11 (not identified by the multiplex PCR). In the majority, fragments of around 700pb were amplified, except for SO-11 (around 650 pb) and SO-2, where no amplicons were obtained,

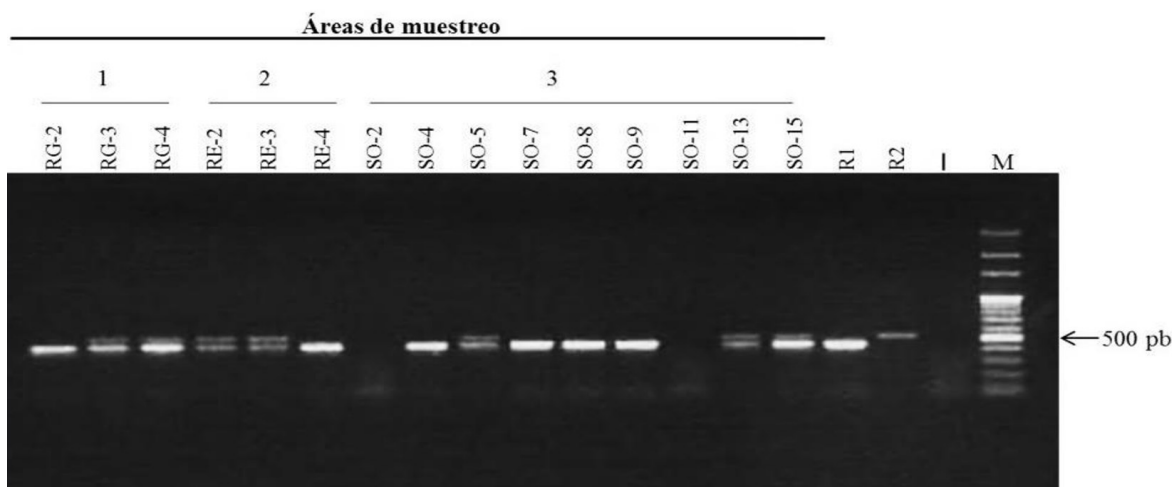


Figura 2. Fragmentos generados por los pares de oligonucleótidos sp13 (que amplifica un fragmento de 445 pb del gen *pgx4*, en las razas 1 y 3) y sp23 (que amplifica un fragmento de 518 pb del gen *pgI*, en las razas 2 y 3) en los aislados de *Fusarium oxysporum*. Se obtuvo un fragmento de unas 445 pb, en los aislados RG-2, RE-4, SO-4, SO-7, SO-8 y SO-9. Mientras que los aislados RG-3, RG-4, RE-2, RE-3, SO-5, SO 13 y SO15, generaron 2 fragmentos de unas 445 y 518 pb, aprox. Los aislados SO-2 y SO-11, no mostraron fragmentos.

Figure 2. Fragments generated by the pairs of oligonucleotides sp13 (which amplifies a fragment of 445 pb of the gene *pgx4* in races 1 and 3) and sp23 (which amplifies a fragment of 518 pb in gene *pgI* in races 2 and 3) in *Fusarium oxysporum* isolates. A fragment of approximately 445 pb was obtained in isolates RG-2, RE-4, SO-4, SO-7, SO-8 and SO-9. Meanwhile, isolates RG-3, RG-4, RE-2, RE-3, SO-5, SO 13 and SO15 generated two fragments of approximately 445 and 518 pb. Isolates SO-2 and SO-11 showed no fragments.

NCBI, todos los aislados mostraron 99% de similitud con la secuencia AB256797.1 (Hirano y Arie, 2006), lo que confirmó que corresponden a *Fol* raza 1. Únicamente en el aislado SO-13 (raza 3), se identificó la presencia de polimorfismos nucleotídicos en las posiciones 64 y 65 con la secuencia AB256797.1, con una G sustituyendo A. Por otra parte, la comparación de secuencias de los fragmentos amplificados con el par de oligonucleótidos sp23 de *pgI* de las cepas identificadas como raza 3, RG-3, RE-2, SO-13 y SO-15, poseen una T en lugar de C en la posición nucleotídica 342 y además no presentan los nucleótidos A y T en los sitios 54 y 66, que las identificarían como raza 3 y mostraron 99% de similitud con la secuencia AB256794.1, perteneciente a un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* y con AB256778.1 de *F. oxysporum* f. sp.

despite having checked the integrity of the DNA and having attempted the PCR several times. When analyzing the amplified sequences of *TEF1-α*, we verified that all isolates, excluding SO-7, belong to the species *F. oxysporum*. Isolate SO-7 was grouped with the sequences of *F. solani* (KT357542.1 and KT357549.1) (Figure 3).

Identification of races using different tomato cultivars

The pathogenicity tests of the *Fol* isolates in tomato plants showed the susceptibility of the varieties according to the variety and the isolate of the fungus. In the Bonny Best cultivar, all isolates caused wilting. Voip9 caused the most damage (41%), followed by Voip14, RE-2, SO-13 and *Fol*

melonis. RE-3, presentó una G en el sitio 342, diferenciándose del resto de los aislados.

Amplificación del factor de elongación (TEF1 α)

Con base en el análisis de la PCR múltiple, se amplificó el TEF1 α de los aislados: Voip4, Voip6, Voip8, Voip9, Voip14, SO-7 (*Fol* raza 1), RG-3, RE-2, SO-13, SO-15 (*Fol* raza 3), SO-2 y SO-11 (no identificados por la PCR múltiple). De la mayoría, se amplificaron fragmentos de alrededor de 700 pb excepto de SO-11 (alrededor de 650 pb) y en SO-2 en donde no se obtuvo amplicón, pese a que la integridad del ADN fue verificada y se intentó la PCR varias veces. Al analizar las secuencias amplificadas del TEF1- α , se verificó que todos los aislados, excepto SO-7 pertenecen a la especie *F. oxysporum*. El aislado SO-7 se agrupó con las secuencias de *F. solani* (KT357542.1 y KT357549.1) (Figura 3).

Identificación de razas utilizando cultivares diferenciales de jitomate

La prueba de patogenicidad de los aislados de *Fol* en plantas de jitomate mostró una susceptibilidad de las variedades de jitomate acorde a la variedad y aislamiento del hongo. En el cultivar Bonny Best, todos los aislados causaron marchitez. Voip9 fue el que causó mayor daño (41%), seguido de Voip14, RE-2, SO-13 y *Fol* R2 (38%); Voip-8, RG-E, SO-11 y *Fol* R1 (32%) y Voip4 y RE-3 (29%). Los que menor daño ocasionaron (25%) fueron los aislados Voip6, SO-15 y SO-7. Las plantas no inoculadas no mostraron ningún daño (Figura 4a).

En Manapal, el aislado Voip9 fue el que causó mayor daño (54%), seguido de SO-15 (41%); Voip14, RG-13, RE-2 y SO-13 y *Fol* R2 (33%); *Fol* R1 (29%); RE-3 y SO-7 (25%), Voip4, Voip6, Voip8 y SO-11 y las plantas control (9%) (Figura 4b).

R2 (38%); Voip-8, RG-E, SO-11 and *Fol* R1 (32%) and Voip4 and RE-3 (29%). The least damaging (25%) were isolates Voip6, SO-15 and SO-7. Plants not inoculated presented no damage (Figure 4a).

In Manapal, isolate Voip9 caused the most damage (54%), followed by SO-15 (41%); Voip14, RG-13, RE-2 and SO-13 and *Fol* R2 (33%); *Fol* R1 (29%); RE-3 and SO-7 (25%), Voip4, Voip6, Voip8 and SO-11 and the control plants (9%) (Figure 4b).

In Walter, all isolates produced over 10% of vascular wilting, except *Fol* R2, which caused 9%; Voip8, Voip9 and *Fol* R1 (45%); Voip14, RE-3, SO-7 (41%); RG-3 y SO-15, (37%); RE-2 and SO-11 (33%); SO-13, Voip4 and Voip6, less than 20% (Figure 4c). In I3R3, isolate *Fol* R1 produced the least wilting (58%), followed by Voip8, Voip14 and SO-13 (53%); RG-3 (50%); RE-2 (45%), Voip9 (41%), Vop6 and RE-2 (38%); SO-15 (32%), SO-11 (25%), Voip4 (19%), SO-7 (8%) and RE-3 (3%) and the control (8%) (Figure 4d). Table 2 shows a summary of the results obtained in the tests for the identification of races according to comparisons between the presence of fragments generated by the sets of race-specific oligonucleotides, the sequences obtained and the *in planta* tests.

Genetic variability of isolates of *Fol* (RAPD)

Oligonucleotides OPA-01, OPA-15, OPA-16 and OPA-17 produced no fragments in *Fol* races 1 and 2, and were therefore discarded for the analysis of variability between races used as a type. The approximate number and sizes of the fragments observed with OPA-03 were eight in *Fol* race 1, sized 1430, 519, 691, 752, 988, 1380, 1413 and 1926 pb, and four in *Fol* race 2, sized 519, 717, 1000 y 1430 pb. With the OPA-05 primer, three fragments of approximately 790, 954 and 1430 pb in *Fol* race 1 were observed, along with four in *Fol* race 2 sized 636, 790, 954 and 1616 pb. Finally, with primer OPA-11, four fragments were obtained

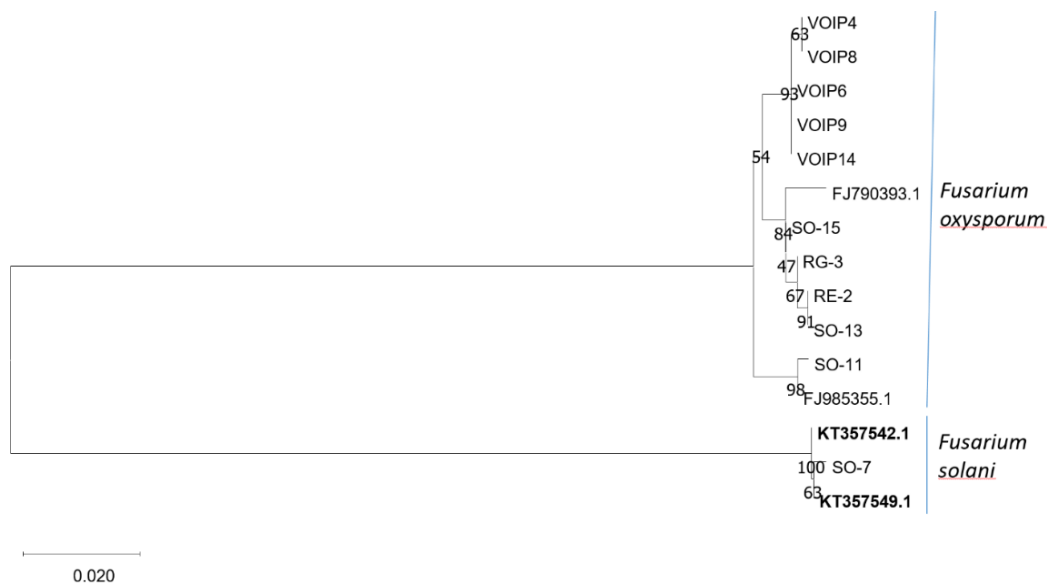


Figura 3. Filograma utilizando el método Neighbor-Joining basado en secuencias de la región TEF1- α con 500 réplicas. Hubo un total de 591 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta (Maximum Composite Likelihood).

Figure 3. Phylogram using the Neighbor-Joining method, based on sequences of the TEF1- α region with 500 replicas. There was a total of 591 positions in the final set of data. The evolutionary analyses were carried out in MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). The tree is drawn to scale, with the length of the branches in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Evolutionary distances were calculated using the Maximum Composite Likelihood method.

En Walter, todos los aislados produjeron arriba del 10% de marchitez vascular, excepto *Fol* R2, que ocasiono 9%; Voip8, Voip9 y *Fol* R1 (45%); Voip14, RE-3, SO-7 (41%); RG-3 y SO-15, (37%); RE-2 y SO-11 (33%); SO-13, Voip4 y Voip6, menos del 20% (Figura 4c). En I3R3, el aislado *Fol* R1 fue el que mayor marchitez produjo (58%); seguido de Voip8, Voip14 y SO-13 (53%); RG-3 (50%); RE-2 (45%), Voip9 (41%), Vop6 y RE-2 (38%); SO-15 (32%), SO-11 (25%), Voip4 (19%), SO-7 (8%) y RE-3 (3%) y el control (8%) (Figura 4d). El Cuadro 2, muestra un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas para la identificación de razas de acuerdo a comparaciones entre la presencia de fragmentos generados por los sets de oligonucleótidos raza-específicos, las secuencias obtenidas y las pruebas *in planta*.

in *Fol* race 1 with approximately 664, 776, 1273 and 1660 pb, and in *Fol* race 2, five fragments sized 430, 607, 725, 1284 and 1637 pb (Figure 5A).

In the evaluation of the isolates obtained in this investigation and using oligonucleotide OPA-05, no specific patterns were found (data not shown), therefore its use was discarded. With OPA-11, seven stripe patterns were obtained, the first of which displayed four fragments sized 664, 776, 1273 and 1660 pb, and it was found in 29 of the isolates obtained, identified as *Fol* race 1 in the previous tests (Voip1-Voip16, Voip18-Voip26, Voip28-Voip30 and SO-11). The second pattern, found in strain Voip15 consisted of two fragments, sized 730 and 1266 bp. The third, with four fragments sized 508, 1343, 1730 and 2134, was found in isolates RG-3 and SO-4. The fourth, sized 745 bp, was

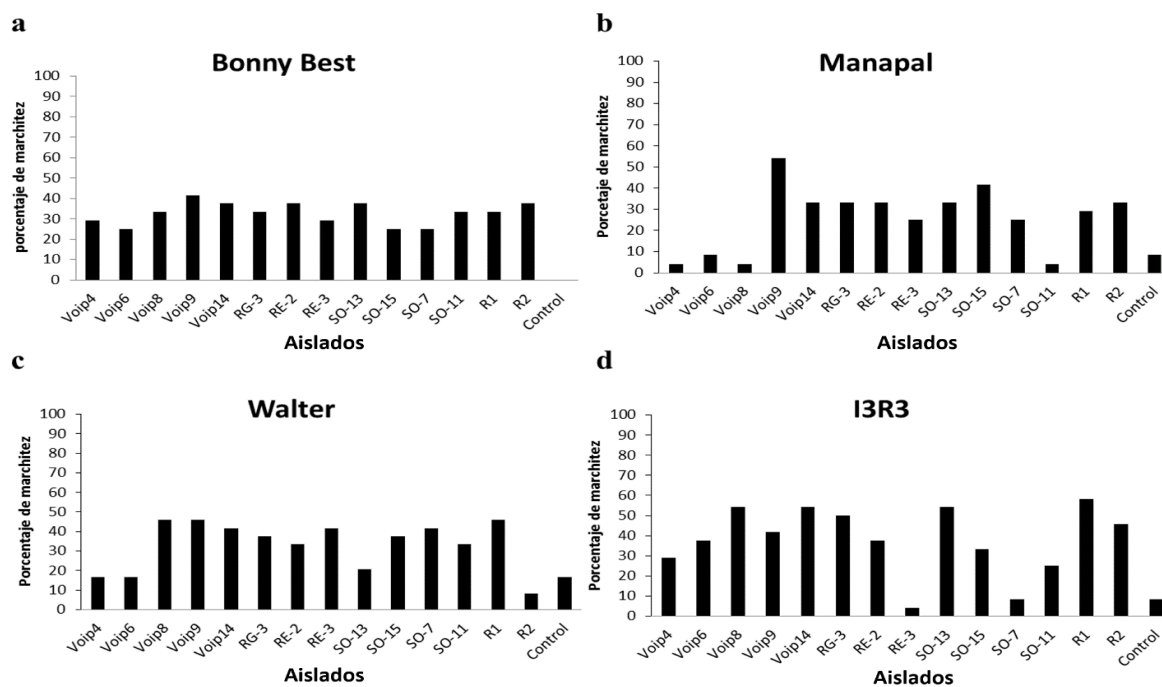


Figura 4. Porcentaje de marchitez ocasionado por los aislados: Voip4, Voip6, Voip8, Voip9, Voip14, RG-3, RE-2, RE-3, SO-13, SO-15, SO-7 y SO-11, en cuatro cultivares de jitomate diferenciales a) Bonny Best, susceptible a las tres razas, b) Manapal, resistente a la raza 1, c) Walter, resistente a las razas 1 y 2 y d) I3R3, resistente a la raza 3.

Figure 4. Percentage of wilting caused by isolates Voip4, Voip6, Voip8, Voip9, Voip14, RG-3, RE-2, RE-3, SO-13, SO-15, SO-7 and SO-11, in four different tomato cultivars a) Bonny Best, susceptible to the three races, b) Manapal, resistant to race 1, c) Walter, resistant to races 1 and 2, and d) I3R3, resistant to race 3.

Variabilidad genética de aislados de *Fol* (RAPD)

Los oligonucleótidos OPA-01, OPA-15, OPA-16 y OPA-17 no generaron ningún fragmento en *Fol* razas 1 y 2, por lo que fueron descartados para el análisis de la variabilidad entre ambas razas usadas como tipo. El número y tamaños aproximados de los fragmentos observados con OPA-03, fueron ocho en *Fol* raza 1 de 1430, 519, 691, 752, 988, 1380, 1413 y 1926 pb y cuatro en *Fol* raza 2 de 519, 717, 1000 y 1430 pb. Con el iniciador OPA-05, se observaron tres fragmentos de alrededor de 790, 954 y 1430 pb en *Fol* raza 1, y cuatro en *Fol* raza 2 de 636, 790, 954 y 1616 pb. Por último, con el iniciador OPA-11, se obtuvieron 4 fragmentos en

found in RG-4. The fifth was sized 500, 775, 871, 1211, 1343, 1645 and 2175 bp in size and found in RE-2, RE-3 and RE-4. The sixth had five fragments sized 742, 1160, 1312, 1632 and 2202, and the seventh, with three fragments, 886, 1166 and 1525 in SO-9. No specific striping pattern was noticed using OPA-11 in the strains that were identified as race 3 using the amplification of polygalacturonase genes (RG-3, RE-2, SO-13 and SO-15) (Figure 5B).

DISCUSSION

The results confirm the presence of *Fol* race 1, *Fol* race 3 and *F. solani* causing vascular wilt in

Cuadro 2. Identificación de razas de acuerdo a comparaciones entre la presencia de fragmentos generados por los sets de oligonucleótidos raza-específicos, las secuencias obtenidas y las pruebas *in planta*.
Table 2. Identification of races by comparison between the presence of fragments generated by the sets of race-specific oligonucleotides, the sequences obtained and the *in planta* tests.

| Aislado | Presencia de fragmento | | Análisis de secuencias | | PCR-múltiple
Raza | Cultivares diferenciales | | | | Raza |
|------------------------|------------------------|-----|------------------------|-----|----------------------|--------------------------|---------|--------|------|------------------|
| | pgx4 | pg1 | pgx4 | pg1 | | Bonny Best | Manapal | Walter | I3R3 | |
| Voip4 | • | X | + | | 1 | S | R | R | S | 1 |
| Voip6 | • | X | + | | 1 | S | R | R | S | 1 |
| Voip8 | • | X | + | | 1 | S | R | S | S | 1 |
| Voip9 | • | X | + | | 1 | S | S | S | S | X |
| Voip14 | • | X | + | | 1 | S | S | S | S | X |
| RG-3 | • | • | + | - | 3 | S | S | S | S | X |
| RE-2 | • | • | + | - | 3 | S | S | S | S | X |
| RE-3 | • | • | + | - | 3 | S | S | S | R | 3 |
| SO-13 | • | • | - | - | 3 | S | S | R | S | X |
| SO-15 | • | • | + | - | 3 | S | S | S | S | X |
| SO-7* | • | X | | | ND | S | S | S | R | <i>F. solani</i> |
| SO-11 ^{&} | X | X | | | ND | S | R | R | S | 1 |

*El fragmento de SO-7, no se secuenció debido a que no pertenece a *Fusarium oxysporum*. / * Fragment SO-7 was not sequenced because it does not belong to *Fusarium oxysporum*.

[&]SO-11 sólo se usó para inocular plantas, no se obtuvieron fragmentos con ningún par de los oligonucleótidos utilizados en los métodos de identificación de razas. / [&]SO-11 was only used to inoculate plants; no fragments were obtained with any pair of the oligonucleotides used in the race identification methods.

• Presencia de fragmento. / • Presence of fragment.

X ausencia de fragmento. / X absence of fragment.

+Coincidencia de la secuenciación con la raza según los fragmentos amplificados. / +Coincidence of sequencing with race, depending on the fragments amplified.

-Presencia de SNPs en la secuencia amplificada, respecto a Hirano y Arie, 2006. / -Presence of SNPs in the amplified sequence, regarding Hirano and Arie, 2006.

Fol raza 1 con tamaños aproximados de 664, 776, 1273 y 1660 pb y en *Fol* raza 2, cinco fragmentos de 430, 607, 725, 1284 y 1637 pb (Figura 5A).

En la evaluación de los aislados obtenidos en esta investigación, usando el oligonucleótido OPA-05, no se encontraron patrones específicos (datos no mostrados), por lo que se descartó su uso. Con OPA-11, se obtuvieron siete patrones de bandas con los siguientes tamaños aproximados. El primer patrón mostró cuatro fragmentos de 664, 776, 1273 y 1660 pb y fue observado en veintinueve aislados obtenidos identificados como *Fol* raza 1 en las pruebas anteriores (Voip1-Voip16, Voip18-Voip26, Voip28-Voip30 y SO-11). El segundo patrón obser-

tomato in Baja California, Mexico. Although the multiplex PCR provided satisfactory results, the SNPs in *pg1* did not meet expectations (Hirano and Arie, 2006). For example, isolate RE-3 presented variations in the sequence of this gene and isolate SO-13, despite being identical to RG-3, RE-2 and SO-15 in the sequence of fragment of gene *pg1*, displayed SNPs in gene *pgx4*, which identified it as a strain of *Fol* f. sp. *tulipae* or *Fol* f. sp. *melonis*. Although the SNPs observed may be due to coincidences between the polygalacturonases with *Fol* ff. spp. *tulipae* or *melonis*, should the identification with the sets of oligonucleotides be correct, it is recommendable to inoculate them in

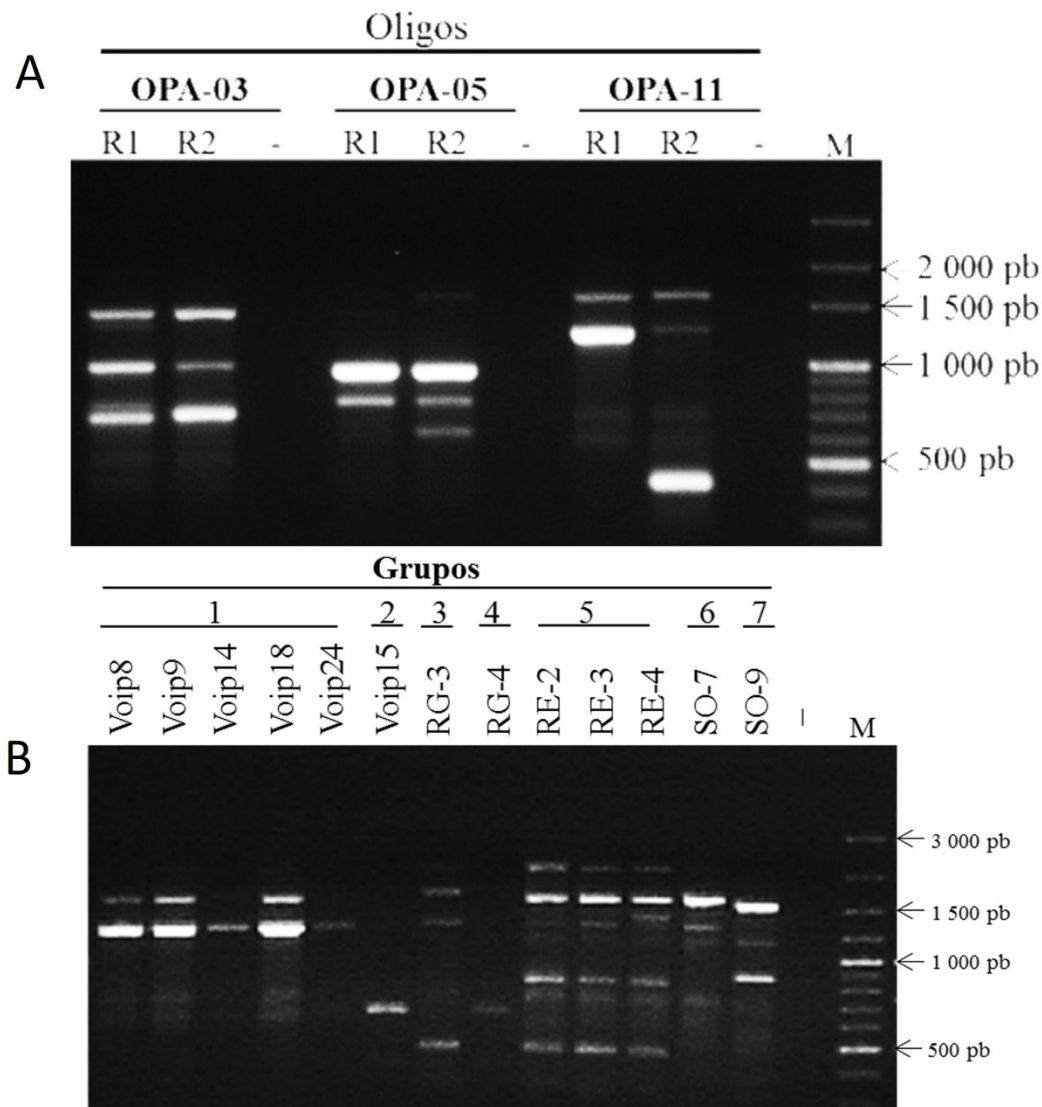


Figura 5. Patrones de bandas observados en el análisis RAPD en cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). A. Patrones de bandas observados en las cepas tipo de Fol razas 1 y 2, generados por los oligonucleótidos universales OPA-03, OPA-05 y OPA-11. B. Fragmentos generados por el oligonucleótido OPA-11, que muestran siete patrones de bandas en los aislados de *Fusarium* obtenidos de jitomate. Los aislados Voip8-Voip24 presentaron el mismo patrón de bandas, al igual que los RE-2, RE-3 y RE-4, los otros cinco presentaron diferente número y tamaño de fragmentos.

Figure 5. Banding patterns observed in the RAPD analysis in strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). A. Banding pattern observed in Fol-type strains, races 1 and 2, generated by universal nucleotides OPA-03, OPA-05 and OPA-11. B. Fragments generated by oligonucleotide OPA-11, showing seven bands pattern in the isolates of *Fusarium* obtained from tomato. Isolates Voip8-Voip24 presented the same pattern of bands, like RE-2, RE-3 and RE-4; the other five presented different fragment numbers and sizes.

vado en la cepa Voip15 fue de dos fragmentos de 730 y 1266 bp. El tercero con cuatro fragmentos de 508, 1343, 1730 y 2134, se observó en los aislados RG-3 y SO-4. El cuarto de 745 bp en RG-4. El quinto con 500, 775, 871, 1211, 1343, 1645 y 2175 bp en RE-2, RE-3 y RE-4. El sexto con cinco fragmentos de 742, 1160, 1312, 1632 y 2202 y el séptimo con tres fragmentos de 886, 1166 y 1525 en SO-9. No se observó un patrón de bandeo específico usando OPA-11 en las cepas que fueron identificadas como raza 3 usando la amplificación de genes de poligalacturonasas (RG-3, RE-2, SO-13 y SO-15) (Figura 5B).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos confirman la presencia de *Fol* raza 1, *Fol* raza 3 y de *F. solani* causando marchitez vascular en tomate en Baja California, México. Aunque la PCR múltiple dio resultados satisfactorios, los SNPs en *pgl* no coincidieron con lo esperado (Hirano y Arie, 2006). Por ejemplo, el aislado RE-3 presentó variaciones en la secuencia de este gen y el aislado SO-13 pese a ser idéntico a RG-3, RE-2 y SO-15 en la secuencia del fragmento del gen *pgl*, mostró SNPs en el gen *pgx4*, que lo identificó como una cepa de *Fol* f. sp. *tulipae* o *Fol* f. sp. *melonis*. Aunque los SNPs observados pueden deberse a coincidencias entre las poligalacturonasas con *Fol* ff. spp. *tulipae* o *melonis*, de ser correcta la identificación mediante los sets de oligonucleótidos, es recomendable inocularlos en tulipán y melón, ya que esta es la primera vez que se relaciona a estas formas especiales como causantes de marchitez en jitomate. Por otro lado, empleando el set sp13 se amplificó el fragmento del gen *pgx4* de *F. solani* (SO-7), lo que indica inespecificidad de los oligonucleótidos. En un estudio similar, éstos marcadores moleculares lograron separar los

tulip and melon, since this is the first time these special forms are related to the cause of wilt in tomato. On the other hand, the use of set sp13 helped amplify the fragment of gene *pgx4* in *F. solani* (SO-7), indicating an unspecificity of the oligonucleotides. In a similar study, these molecular markers separated the isolates of race 3 and races 1 and 2, yet they were unable to discriminate between the isolates of races 1 and 2 (Gonçalves *et al.*, 2016). Due to this, the development of new markers is recommended to discriminate between races of *Fol*.

It is necessary to mention that in the *in planta* tests, some inconsistencies were observed, perhaps due to cross-contamination due to the experimental design, since the plants were randomly placed. For example, isolates Voip9 and Voip14 presented virulence in the four cultivars used, even though they were identified as race 1, based on the *pgx4* sequencing. Additionally, Voip8 and SO-11 affected the cultivar Walter (resistant to races 1 and 2). Vascular wilting was also observed in plants of the cultivars Bonny Best, Manapal and Walter, inoculated with SO-7 (*F. solani*). This species causes the foot rot of tomatoes (Vawdrey and Peterson, 1988), but this is the first time that resistance is reported for cultivar I3R3. However, it is convenient for growers to use cultivars or rootstocks that are resistant to the three races of *Fol*, and an investigation of the origin of resistance in I3R3 to *F. solani* would be appropriate.

Another aim of this work was to determine the presence of variability in the race of *Fol*. RAPD molecular markers have been used before to differentiate special forms within the species *F. oxysporum* (Luna-Paez *et al.*, 2004; Shimazu *et al.*, 2005; Baysal *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010). In addition, this technique has been used to find polymorphisms between races of several special forms, including *cubense*, *dianthi*, *pisi*, *vasinfectum*

aislados de la raza 3 de las razas 1 y 2, pero no fueron capaces de discriminar entre los aislados de las razas 1 y 2 (Gonçalves *et al.*, 2016). Por ello, se recomienda desarrollar nuevos marcadores para discriminar entre las razas de *Fol*.

Es preciso mencionar que en las pruebas *in planta*, se observaron algunas inconsistencias, quizá debidas a contaminación cruzada, por el diseño experimental, ya que las plantas fueron ubicadas completamente al azar. Por ejemplo, los aislados Voip9 y Voip14, presentaron virulencia en los cuatro cultivares utilizados, aunque fueron identificados como raza 1, con base en la secuenciación de *pgx4*. Además, Voip8 y SO-11, afectaron al cultivar Walter (con resistencia a las razas 1 y 2). También se observó marchitez vascular en las plantas de los cultivares Bonny Best, Manapal y Walter, inoculadas con SO-7 (*F. solani*), ésta especie causa pudrición del pie del jitomate (Vawdrey y Peterson, 1988), pero esta es la primera vez que se reporta la resistencia del cultivar I3R3. Aunque, es conveniente que los productores utilicen cultivares o portainjertos resistentes a las tres razas de *Fol*, sería adecuado investigar el origen de la resistencia en I3R3 a *F. solani*.

Otro objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de variabilidad en las razas de *Fol*. El uso de marcadores moleculares RAPDs, se ha utilizado con anterioridad para diferenciar formas especiales dentro de la especie *F. oxysporum* (Luna-Paez *et al.*, 2004; Shimazu *et al.*, 2005; Baysal *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010). Además, por medio de esta técnica se ha detectado la presencia de polimorfismos entre razas de varias formas especiales, incluidas, *cubense*, *dianthi*, *pisi*, *vasinfectum* y *ciceris* (Bentley *et al.*, 1994; Grajal *et al.*, 1993; Migheli *et al.*, 1998; Assigbetse *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2001; Katkar y Mane, 2012). Los oligonucleótidos universales OPA-03, OPA-05 y OPA-11, generaron distintos patrones de bandas en las razas tipo 1 y

and *ciceris* (Bentley *et al.*, 1994; Grajal *et al.*, 1993; Migheli *et al.*, 1998; Assigbetse *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2001; Katkar and Mane, 2012). Universal oligonucleotides OPA-03, OPA-05 and OPA-11 generated different banding patterns in races type 1 and 2. However, only oligonucleotide OPA-11 presented different patterns. The number and size of the fragments generated by *Fol* race 3 was equal to those found in isolates RE-2 and RE-4 (Figure 5). Although the former displayed a SNP in gene *pgl* and affected cultivar I3R3, it most likely belongs to race 3. Isolates Voip1-Voip16, Voip18-Voip26, Voip28-Voip30 and SO-11 displayed stripe patterns similar to those for race 1 and generated only the fragment of gene *pgx4*, which confirms that it belongs to that race, although in some isolates, such as Voip14 and Voip24, the stripes were the faintest (Figure 5). OPA-11 also produced a unique stripe pattern for *F. solani* (SO-7), and it can therefore be used to quickly determine the presence of this pathogen in different economically important cultivars.

CONCLUSIONS

Out of 60 tomato plants with vascular wilting, 44 *F. oxysporum* and one *F. solani* isolates were obtained. Although the sets of race-specific oligonucleotides were used in a satisfactory way in a multiplex PCR reaction, they displayed unspecificity. The *in planta* tests with different cultivars helped confirm the presence of *Fol* races 1 and 3 in Baja California. For *Fol* race 3, the results were confirmed with the sequences of the fragments of gene *pgl*. Race 1 prevailed in sampled plants, infecting the cultivars Herlum, Cherry, Cherry-zebra and Cherry, whereas race 3 was found to be related to the cultivar Herlum. Using the RAPD technique, genetic polymorphisms were found that

2. Sin embargo, solamente con el oligonucleótido OPA-11 se observaron diferencias en los patrones. El número y tamaño de los fragmentos generados por *Fol* raza 3 (RE-3) fue igual al observado en los aislados RE-2 y RE-4 (Figura 5B). El primero, aunque presentó un SNP en el gen *pgl* y afectó al cultivar I3R3, lo más probable es que pertenezca a la raza 3. Los aislados Voip1-Voip16, Voip18-Voip26, Voip28-Voip30 y SO-11 mostraron patrones de bandas similares a la raza 1 y generaron solo el fragmento del gen *pgx4*, lo que confirma que pertenecen a esa raza. Aunque en algunos aislados como Voip14 y Voip24 las bandas fueron más tenues (Figura 5). OPA-11 también generó un patrón de bandas único para *F. solani* (SO-7), por lo que puede ser utilizado para una determinación rápida de la presencia de este patógeno en diferentes cultivos económicamente importantes.

CONCLUSIONES

De 60 plantas de jitomate con síntomas de marchitez vascular, se obtuvieron 44 aislados de *F. oxysporum* y uno de *F. solani*. Aunque los sets de oligonucleótidos raza-específicos se usaron satisfactoriamente en una reacción de PCR múltiple, mostraron inespecificidad. Las pruebas *in planta* con cultivares diferenciales, permitieron confirmar la presencia de *Fol* razas 1 y 3 en Baja California. Para *Fol* raza 3, los resultados fueron corroborados con las secuencias de los fragmentos del gen *pgl*. La raza 1 prevaleció en las plantas muestreadas, infectando a los cultivares Herlum, Cherry, Cherryzebra y Cherry, mientras que la raza 3 se encontró asociada al cultivar tipo Herlum. Usando la técnica de RAPD se encontraron polimorfismos genéticos que permiten diferenciar a la *Fol* raza 1 de *Fol* raza 2 y *Fol* raza 3.

help distinguish *Fol* race 1 from *Fol* race 2 and *Fol* race 3.

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

## LITERATURA CITADA

- Ascencio-Álvarez A, López-Benítez A, Borrego-Escalante F, Rodríguez-Herrera SA, Flores-Olivas A, Jiménez-Díaz F y Gámez-Vázquez, AJ. 2008. Marchitez vascular del jitomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 26(2):114-120. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61226203>
- Assigbetse KB, Fernández D, Dubois MP and Geiger JP. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. Phytopathology 84: 622-626. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1994Articles/Phyto84n06\\_622.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1994Articles/Phyto84n06_622.PDF)
- Baysal Ö, Siragusa M, Ikten H, Polat I, Gümürkücü E, Yigit F, Carimi JA and da Silva JT. 2009. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. Physiological and Molecular Plant Pathology 74(1): 68-75. <https://doi.org/doi:10.1016/j.pmp.2009.09.008>
- Baysal Ö., Siragusa M, Gumrukcu E, Zengin S, Carimi F, Sajeva M and Teixeira da Silva, JA. 2010. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. Biochemical genetics 48(5-6):524-37. <https://doi.org/doi:10.1007/s10528-010-9336-1>
- Bentley S, Pegg KG and Dale JL. 1994. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Journal of Phytopathology 142:164-78. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1439-0434.1994.tb00008.x>
- Biju VC, Fokkens L, Houterman PM, Rep M and Cornelissen BJ. 2017. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Applied and environmental microbiology 83(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.02548-16>
- Cai G, Gale LR, Schneider RW, Kistler HC, Davis RM, Elias KS and Miyao EM. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93(8):1014-1022. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.8.1014>
- Carrillo Fasio JA, Montoya Rodríguez TJ, García Estrada RS, Cruz Ortega JE, Márquez Zequera I y Sañudo Barajas AJ. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Snyder y Hansen en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:123-127. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221205>

- Chang YD, Du B, Wang L, Ji P, Xie Y J, Li X F and Wang JM. 2018. A study on the pathogen species and physiological races of tomato *Fusarium* wilt in Shanxi, China. *Journal of Integrative Agriculture* 17:1380-1390. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61983-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61983-5)
- Gonçalves AM, Costa H, Fonseca MEN, Boiteux LS, Lopes CA and Reis A. 2016. Variability and geographical distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* physiological races and field performance of resistant sources in Brazil. In V International Symposium on Tomato Diseases: Perspectives and future directions in tomato protection 1207 (pp. 45-50). <https://biblioteca.incap.es.gov.br/digital/bitstream/123456789/3237/1/goncalves2018.pdf>
- Grajal MJ, Simon CJ and Muehlbauer FJ. 1993. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 83:612-614. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1993Articles/Phyto83n06\\_612.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1993Articles/Phyto83n06_612.PDF)
- Hernández Martínez R, López Benítez A, Borrego Escalante F, Espinoza Velázquez J, Sánchez Aspeytia D, Maldonado Mendoza IE y López Ochoa LA. 2014. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios jitomateros en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7):1169-1178. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/838/661>
- Hirano Y and Arie T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology* 72(5):273-283. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0287-7>
- Holguín-Peña RJ. 2005. *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in Baja California Sur, México. *Plant Disease* 89(12):1360-1360. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1360C>
- Isaac MR and Leyva-Mir SG, Sahagun-Castellanos J, Camara-Correia K, Tovar-Pedraza JM y Rodriguez-Perez JE. 2018. Occurrence, identification, and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tomato wilt in Mexico. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46(2):484-493. <https://doi.org/10.15835/nbha46211095>
- Jiménez Gasco MM, Pérez E and Jiménez RM. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology* 107:237-248. <https://doi.org/10.1023/A:1011294204630>
- Katkar M and Mane SS. 2012. Characterization of Indian races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* through RAPD markers. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* 5(4):323-328. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijaeb&volume=5&issue=4&article=003>
- Kawabe M, Kobayashi Y, Okada G, Yamaguchi I, Teraoka T and Arie T. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and pg1, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *Journal of General Plant Pathology* 71(4):263-272. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0203-6>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lievens B, Van Baarlen P, Verreth C, Van Kerckhove S, Rep M and Thomma BP. 2009. Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1 $\alpha$  and exopolygalacturonase sequences. *Mycological research* 113(10):1181-1191. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756209001452>
- Leslie JF and Summerell BA. 2008. *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.
- Lin YH, Chen KS, Chang JY, Wan YL, Hsu CC, Huang JW and Chang PFL. 2010. Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. *New Biotechnology* 27(4):409-18. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.05.005>
- Luna-Paez A, Silva-Rojas HV, Marbán-Mendoza N y Valadez-Moctezuma E. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD'S en el Bajío de México. *Revista Mexicana Fitopatología* 22:44-51. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1562-30092009000300004&script=sci\\_abstract](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1562-30092009000300004&script=sci_abstract)
- Martel MB, Létoublon R and Fèvre M. 1998. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS microbiology letters* 158(1):133-138. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12812.x>
- Migheli Q, Briatore E and Garibaldi A. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 3 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*. 104:49-57. <https://doi.org/10.1023/A:1008682328764>
- Murugan L, Krishnan N, Venkataravanappa V, Saha S, Mishra AK, Sharma BK and Rai AB. 2020. Molecular characterization and race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting tomato in India. *3 Biotech* 10(11):1-12. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02475-z>
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(5):2044-2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- Pirayesh S, Zamanizade H and Morid B. 2018. Molecular Identification of Physiological Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis lycopersici* Causal Agent of *Fusarium* Wilt of Tomato in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 20(1):193-202. <https://jast.modares.ac.ir/article-23-4759-en.html>
- Shimazu J, Yamauchi N, Hibi T, Satou M, Horiuchi S and Shirakawa T. 2005. Development of sequence tagged site markers to identify races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Journal of General Plant Pathology* 71(3):183-189. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0183-6>



- SIAP, 2019. Recuperado 13 de octubre de 2020: [http://info-siap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/Resumen-Delegacion.do](http://info-siap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/Resumen-Delegacion.do)
- Valenzuela-Ureta JG, Lawn DA, Heisey RF and Zamudio-Guzman V. 1996. First report of Fusarium wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. *Plant Disease* 80(1):105. [https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1996Abstracts/PD\\_80\\_0105A.htm](https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1996Abstracts/PD_80_0105A.htm).
- Vakalounakis DJ and Fragkiadakis GA. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: Differentiation by Pathogenicity, Vegetative Compatibility, and RAPD Fingerprinting. *Phytopathology* 89(2):161-8. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.2.161>
- Vawdrey LL and Peterson RA. 1988. *Fusarium solani*, the cause of foot rot of tomatoes in Central Queensland. *Australasian Plant Pathology*, 17(1):24-25. <https://doi.org/10.1071/APP9880024>

# Fungi associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) wilt in Costa Rica

## Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica

**María del Milagro Granados-Montero\*** Centro de Investigación en Protección de Cultivos y Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas, Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica; **Néstor Chaves-Barrantes**, Programa de Leguminosas, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica. 183-4050 Alajuela, Costa Rica; **Priscila Chaverri**, <sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 11501-2060, San José, Costa Rica y Department of Plant Sciences and Landscape Architecture, University of Maryland, College Park, Maryland, 20742, U.S.A.; **Juan Carlos Hernández-Fonseca**, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), 382-1007 Centro Colón, Costa Rica; **Efraín Escudero-Leyva**.

\*Autor para correspondencia: maria.granadosmontero@ucr.ac.cr.

Recibido: 11 de Noviembre, 2020.

Aceptado: 17 de Febrero, 2021.

Granados-Montero MM, Chaves-Barrantes N, Chaverri P, Hernández-Fonseca JC and Escudero-Leyva E. 2021. Fungi associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) wilt in Costa Rica. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 289-301.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2011-1>

Primera publicación DOI: 05 de Marzo, 2021.

First DOI publication: March 05, 2021.

**Resumen.** Las pudriciones radicales limitan el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris*), y aunque en Costa Rica son frecuentes, la identidad de los hongos asociados a ellas es incierta. El objetivo de esta investigación fue identificar molecularmente los hongos asociados a las pudriciones radicales y marchitez del frijol en las dos principales zonas productoras del país. Entre 2017 y 2020,

**Abstract.** Root rot limits the performance of beans (*Phaseolus vulgaris*), and although they are frequent in Costa Rica, the identity of the fungi associated with them is uncertain. The objective of this research was to molecularly identify the fungi associated with root rot and wilt of beans in the two main producing areas of the country. Between 2017 and 2020, 120 plants were collected in 20 farms in the Huetar Norte and Brunca regions. Experimental lines (IBC 302-29 and ALS 0536-6) and commercial varieties (Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí and Tayní) were sampled. The symptoms observed in the field were described and isolates were made on chloramphenicol bengal rose water agar, then pure hypha-tip cultures on water agar, which were transferred to potato dextrose agar to determine morphotypes with the use of taxonomic keys. Isolated fungi were also identified by

se recolectaron 120 plantas en 20 fincas de las regiones Huetar Norte y Brunca. Se muestrearon líneas experimentales (IBC 302-29 y ALS 0536-6) y variedades comerciales (Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí y Tayní). Se describieron los síntomas observados en campo y se efectuaron aislamientos en agar agua rosa de bengala cloranfenicol, luego cultivos puros de punta de hifa en agar agua, que se transfirieron a papa dextrosa agar para determinar morfotipos con el uso de claves taxonómicas. Los hongos aislados también se identificaron mediante secuenciación de la región ITS del ADN nuclear ribosomal. Se calculó el porcentaje de frecuencia relativa de morfotipos. Los más frecuentes fueron *Macrophomina phaseolina* (26.7%), *Fusarium oxysporum* (13.6%) y *Athelia rolfsii* (5.6%). A partir de los síntomas de marchitez observados en campo se aislaron los hongos comúnmente descritos en frijol para esas patologías. Es necesario realizar pruebas de patogenicidad para confirmar que son los agentes causales.

**Palabras clave:** Patógenos de la raíz, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Athelia rolfsii*.

El frijol es consumido por el 97 % de la población costarricense, es un grano fundamental para la seguridad alimentaria y nutricional del país, y su producción está principalmente en manos de pequeños productores (<5 ha) (Hernández-Fonseca, 2009; Rodríguez-González y Fernández-Rojas, 2015). El cultivo enfrenta una serie de limitantes, como las enfermedades, que pueden reducir significativamente la productividad (Schoonhoven y Voysest, 1994). Entre ellas, los patógenos de la raíz como *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. y *Pythium* sp. tienen el potencial de causar pérdidas entre un 80 y 100%

sequencing the ITS region of ribosomal nuclear DNA. The percentage of relative frequency of morphotypes was calculated. The most frequent were *Macrophomina phaseolina* (26.7%), *Fusarium oxysporum* (13.6%) and *Athelia rolfsii* (5.6%). From the wilt symptoms observed in the field, the fungi commonly described in beans for these pathologies were isolated. It is necessary to perform pathogenicity tests to confirm that they are the cause of the infections.

**Key words:** Soil-borne pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Athelia rolfsii*.

Beans are consumed by 97% of the Costa Rican population, and are a crucial grain for food and nutritional security, and its production is mainly in the hands of small-scale farmers (<5 ha) (Hernández-Fonseca, 2009; Rodríguez-González and Fernández-Rojas, 2015). The crop faces a series of limitations, such as diseases, which may reduce its productivity significantly (Schoonhoven and Voysest, 1994). Among these diseases, root pathogens such as *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. and *Pythium* sp. have the potential to produce losses of 80 to 100% of the yield (Singh and Schwartz, 2010; Méndez-Aguilar *et al.*, 2013).

The most efficient way to manage pathological problems, and particularly soil diseases, is through the use of resistant cultivars (Mendes *et al.*, 2019). Since 1995, in Costa Rica the methodology of participative plant breeding has been used, helping generate varieties with a greater resistance to biotic and abiotic problems, higher productivity and better adapted to conditions of small-scale farming (Hernández *et al.*, 2018).

en rendimiento (Singh y Schwartz, 2010; Méndez-Aguilar *et al.*, 2013).

La manera más eficiente de combatir los problemas patológicos, y en especial las enfermedades del suelo, es a través de la generación de cultivares resistentes (Mendes *et al.*, 2019). Desde 1995, en Costa Rica se trabaja bajo la metodología de fitomejoramiento participativo, lo que ha permitido generar variedades con mayor resistencia a problemas bióticos y abióticos, alta productividad y mejor adaptadas a las condiciones de pequeño productor (Hernández *et al.*, 2018).

El cambio en el uso de variedades comerciales, las alteraciones en el clima y la incorporación de nuevas áreas de cultivo, han favorecido el progreso de epidemias de pudrición radicular en Costa Rica, asociadas principalmente a *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Athelia rolfsii* (sin. *Sclerotium rolfsii*) y *Macrophomina phaseolina* (Araya y Hernández, 2003; Araya y Hernández, 2006). Sin embargo, la presencia de dichos agentes causales no se ha demostrado, y las publicaciones existentes se basan únicamente en la comparación de síntomas de campo con los reportados en la literatura; no hay referencias de aislamientos ni de identificación a nivel molecular. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue identificar morfológica y molecularmente los hongos asociados a las pudriciones radicales y marchitez del frijol común en las principales zonas productoras de Costa Rica.

Para este trabajo, se recolectaron 120 plantas en diferentes estados fenológicos (desde plántulas a plantas en llenado de vainas), distribuidas en ocho fincas de la región Brunca (2017 y 2018) al sureste de Costa Rica, y 12 de la región Huetar Norte (2019 y 2020), al norte del país. Se muestreó en parcelas de las líneas experimentales ALS 0536-6 e IBC 302-29, así como de las variedades comerciales Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí y Taynín (Hernández-Fonseca y Araya-Villalobos,

The change in the use of commercial varieties, climate change and the incorporation of new production areas have benefitted the progress of root rot epidemics in Costa Rica related mainly to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Athelia rolfsii* (sin. *Sclerotium rolfsii*) and *Macrophomina phaseolina* (Araya and Hernández, 2003; Araya and Hernández, 2006). However, the presence of such causal agents has not been proven and existing publications are based only on the comparison of field symptoms with those reported in literature; there are no references of isolations or identification at a molecular level. Due to this, the aim of the present investigation was to identify, both morphologically and molecularly, the fungi associated with root rot and wilting of common bean plants in the main production areas of Costa Rica.

For this investigation, 120 plants in different phenological stages were sampled (from seedlings to plants in filling of pods), distributed into eight farms of the region of Brunca (2017 and 2018) in southeastern Costa Rica, and 12 from the region of Norte (2019 and 2020), in the north of the country. Samples were taken in fields of the experimental lines ALS 0536-6 and IBC 302-29, as well as of the commercial varieties Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí and Taynín (Hernández-Fonseca and Araya-Villalobos, 2009; Hernández-Fonseca and Chaves-Barrantes, 2016).

Three plants with symptoms and three asymptomatic plants were taken from each farm. Asymptomatic plants were collected to isolate endophytic fungi with possible antagonistic abilities. Sections of tissue were taken and washed with soap and water, and were later disinfected with alcohol at 70% for 1 min and isolations were performed with chloramphenicol bengal rose water agar culture medium, and incubated for seven days in the dark, between 23 and 25 °C. This was followed by pure hypha-tip cultures on

2009; Hernández-Fonseca y Chaves-Barrantes, 2016).

Se recolectaron tres plantas con síntomas y tres asintomáticas de cada finca. Las plantas asintomáticas se colectaron para aislar hongos endófitos con posible capacidad antagonista. Se tomaron secciones de tejido y se lavaron con agua y jabón, luego se desinfectaron con alcohol al 70% por 1 min y se realizaron aislamientos en medio de cultivo agar-agua-rosa de bengala-cloranfenicol, se incubaron por siete días en oscuridad, entre 23 y 25 °C. Se realizaron cultivos de punta de hifa en agar-agua 30 g L<sup>-1</sup> (3%) y la identificación de morfotipos en papa dextrosa agar (PDA), de acuerdo con las descripciones de Leslie y Summerell (2006) y Seifert *et al.* (2011). Con estos datos se calculó el porcentaje de frecuencia relativa (% FR) de acuerdo con Mueller *et al.* (2004), mediante la fórmula: % FR = (número de aislamientos de cada especie/número total de aislamientos) x 100. Se seleccionaron los más frecuentes para realizar la identificación molecular.

El ADN se extrajo con el kit Prepman Ultra y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores ITS-5 (GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de la región del espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (nrDNA ITS por sus siglas en inglés) (Schoch *et al.*, 2012). Se preparó una reacción de PCR (25 µL) según White *et al.* (1990), los productos se enviaron a Macrogen (USA) para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el uso de Geneious, versión 10.2.3, y se compararon con las disponibles en GenBank por medio del algoritmo BLASTn. Se consideró como identificación positiva de especie si las secuencias obtuvieron similitudes de 100%, como posible especie si obtuvieron 99% (se anotó el sufijo cf.) y si obtuvieron entre 96-98% como especie relacionada (se anotó el sufijo aff.) (Hofstetter *et*

water agar 30 g L<sup>-1</sup> (3%), and the identification of morphotypes in potato-dextrose-agar (PDA), following descriptions by Leslie and Summerell (2006) and Seifert *et al.* (2011). Using these data, the percentage of relative frequency (%FR) was calculated following Mueller *et al.* (2004), using the formula: %FR = (number of isolations of each species/total number of species) x 100. The most frequent were selected to carry out molecular identification.

The DNA was extracted using the Prepman Ultra kit and the polymerase chain reaction (PCR) was carried out using primers ITS-5 (GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) and ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) of the region of the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA ITS) (Schoch *et al.*, 2012). A PCR reaction (25 µL) was prepared following White *et al.* (1990), and the products were sent to Macrogen (USA) for purification and sequencing. The sequences obtained were edited and aligned with the use of Geneious, version 10.2.3 and compared with those available in the GenBank using the algorithm BLASTn. A species identification was considered as positive when the sequences had a similarity of 100 %, as a possible species if it obtained 99% (suffix cf. was written), and as a related species if it obtained 96 to 98% (suffix aff. was written) (Hofstetter *et al.*, 2019). For the range of the genus, a similarity of 97% was considered (López *et al.*, 2017).

The 155 isolations recovered from symptomatic and asymptomatic plants were classified into nine morphotypes (Figure 1). The fungi with the highest percentage of relative frequency were *M. phaseolina* (26.7), *F. oxysporum* (13.6) and *A. rolfsii* (5.6).

The recovered fungi varied according to the year and region of sampling. For example, *A. rolfsii* was recovered on all four years of sampling in both

*al.*, 2019). Para el rango de género se consideró una similitud del 97% (López *et al.*, 2017).

Los 155 aislamientos recuperados, tanto de plantas con síntomas como asintomáticos, se clasificaron en nueve morfotipos (Figura 1). Los hongos con mayor porcentaje de frecuencia relativa fueron *M. phaseolina* (26.7), *F. oxysporum* (13.6) y *A. rolfsii* (5.6).

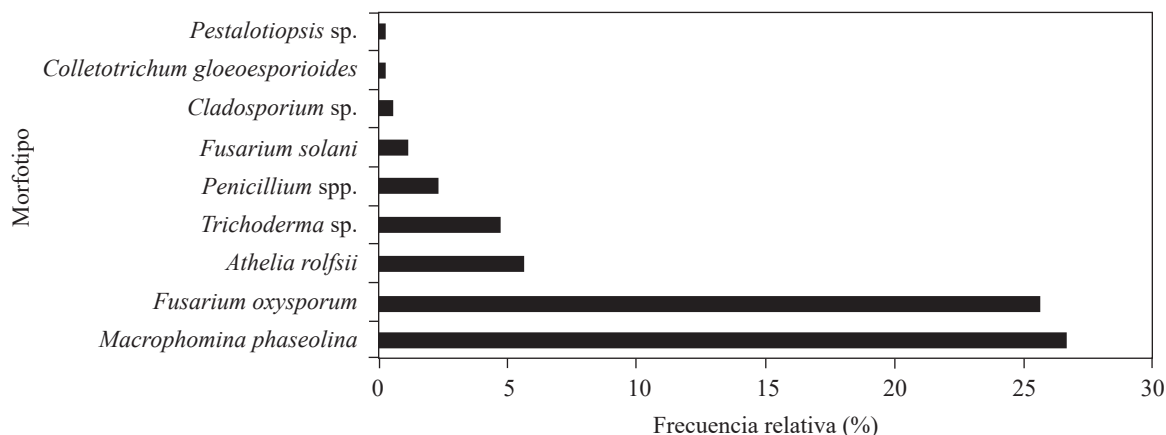
Los hongos recuperados variaron de acuerdo al año y a la región de muestreo. Por ejemplo, *A. rolfsii* fue posible recuperarlo los cuatro años de muestreo en ambas regiones, mientras que *M. phaseolina* solo se aisló en el 2019 en la región Huetar Norte (Cuadro 1).

En plantas con síntomas de marchitez, *M. phaseolina* y *F. oxysporum* fueron aislados con mayor frecuencia en la variedad Cabécar, mientras que, *A. rolfsii* se encontró con mayor frecuencia en las variedades Nambí, Brunca y Chánguena (Cuadro 2). En general, se encontró *F. oxysporum*, *F. solani* y *A. rolfsii* como hongos asociados a plantas con problemas de marchitez, en casi todas las variedades comerciales y líneas experimentales muestreadas.

regions, whereas *M. phaseolina* was only isolated in 2019 in the region of Huetar Norte (Table 1).

In plants with symptoms of wilting, *M. phaseolina* and *F. oxysporum* were isolated more frequently in the variety Cabécar, while *A. rolfsii* was found most often in the varieties Nambí, Brunca and Chánguena (Table 2). In general, *F. oxysporum*, *F. solani* and *A. rolfsii* were found as fungi related to plants with problems of wilting in almost all commercial varieties and experimental lines sampled.

The sequencing of the ITS region showed that the *Fusarium* morphotypes were located in the operative taxonomic units *F. fujikuroi*, *F. solani* and *F. oxysporum*. The fungus classified preliminarily as *M. phaseolina* had a percentage of similarity of 100%. The isolations tentatively defined as *Penicillium* spp. were classified as *P. crustosum*, *P. simplicissimum*, *Penicillium* sp. and *Talaromyces pinophilus* (Table 3). No DNA from *A. rolfsii* was sequenced, since its morphological characteristics were enough to identify it, and they coincided with those described by Kamil *et al.* (2020): cottonlike white mycelium with clamp connections in both



**Figura 1.** Frecuencia relativa (%) de morfotipos de hongos aislados de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en las regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica durante el año 2017-2020.

**Figure 1.** Relative frequency (%) of morphotypes of fungi isolated from common bean plants (*Phaseolus vulgaris*) in the regions of Huetar Norte and Brunca, Costa Rica during the years 2017-2020.

**Cuadro 1. Frecuencia relativa (%) de morfotipos por región productora, año de recolecta y estado de la planta (con síntoma/sin síntoma) de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Costa Rica. Año 2017-2020.**  
**Table 1. Relative frequency (%) of morphotypes by region of production, year collected and state (with symptoms/asymptomatic) of the common bean plant (*Phaseolus vulgaris*). Costa Rica. Year 2017-2020.**

| Morfotipo                            | Brunca <sup>x</sup> (21.3) |                |      |      | Huetar Norte (78.7) |       |       |      |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------|------|------|---------------------|-------|-------|------|
|                                      | 2017 <sup>y</sup>          |                | 2018 |      | 2019                |       | 2020  |      |
|                                      | 16.77                      |                | 4.51 |      | 40.64               |       | 38.06 |      |
|                                      | € <sup>z</sup>             | € <sup>z</sup> | €    | €    | €                   | €     | €     | €    |
|                                      | 7.74                       | 9.03           | 2.58 | 1.93 | 21.29               | 19.35 | 37.42 | 0.64 |
| <i>Athelia rolfsii</i>               | 0.64                       | 0.00           | 1.29 | 0.00 | 0.64                | 0.00  | 9.68  | 0.00 |
| <i>Cladosporium</i> spp.             | 0.00                       | 0.00           | 0.00 | 1.29 | 0.00                | 0.00  | 0.00  | 0.00 |
| <i>Colletotrichum gloesporioides</i> | 0.00                       | 0.00           | 0.00 | 0.64 | 0.00                | 0.00  | 0.00  | 0.00 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>            | 2.58                       | 0.64           | 0.00 | 0.00 | 0.00                | 0.00  | 23.87 | 0.64 |
| <i>Fusarium solani</i>               | 0.64                       | 0.00           | 0.64 | 0.00 | 0.00                | 0.00  | 1.29  | 0.00 |
| <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 0.00                       | 0.00           | 0.00 | 0.00 | 20.65               | 19.35 | 0.00  | 0.00 |
| <i>Penicillium</i> spp.              | 0.64                       | 4.52           | 0.00 | 0.00 | 0.00                | 0.00  | 0.00  | 0.00 |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp.            | 0.00                       | 0.64           | 0.00 | 0.00 | 0.00                | 0.00  | 0.00  | 0.00 |
| <i>Trichoderma</i> sp.               | 3.23                       | 3.23           | 0.64 | 0.00 | 0.00                | 0.00  | 2.58  | 0.00 |

<sup>x</sup> Región productora; <sup>y</sup> Año; <sup>z</sup>€: plantas con síntomas, €: plantas asintomáticas. / <sup>x</sup> Region of production; <sup>y</sup> Year; <sup>z</sup>€: plants with symptoms, €: asymptomatic plants

**Cuadro 2. Frecuencia relativa (%) de morfotipos por variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), recuperados a partir de plantas con y sin síntomas de marchitez. Regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica. Año 2017-2020.**  
**Table 2. Relative frequency (%) of morphotypes by variety of common bean (*Phaseolus vulgaris*), recovered from plants with and without symptoms of wilting. Regions of Huetar Norte and Brunca, Costa Rica. Years 2017-2020.**

| Morfotipo                            | Variedad       |       |                |      |           |      |        |      |            |      |            |      |       |      |                 |       |
|--------------------------------------|----------------|-------|----------------|------|-----------|------|--------|------|------------|------|------------|------|-------|------|-----------------|-------|
|                                      | Brunca         |       | Cabécar        |      | Chánguena |      | Guaymí |      | IBC 302-29 |      | ALS 0536-6 |      | Nambí |      | Nd <sup>y</sup> | Tayní |
|                                      | € <sup>z</sup> | €     | € <sup>z</sup> | €    | €         | €    | €      | €    | €          | €    | €          | €    | €     | €    | €               |       |
| <i>Athelia rolfsii</i>               | 3.23           | 0.00  | 0.00           | 3.23 | 0.64      | 0.00 | 0.00   | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 4.52       | 0.00 | 0.64  | 0.00 |                 |       |
| <i>Cladosporium</i> sp.              | 0.00           | 0.00  | 0.64           | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 0.00   | 0.00 | 0.00       | 0.64 | 0.00       | 0.00 | 0.00  | 0.00 |                 |       |
| <i>Colletotrichum gloesporioides</i> | 0.00           | 0.00  | 0.64           | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 0.00   | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 0.00  | 0.00 |                 |       |
| <i>Fusarium oxysporum</i>            | 2.58           | 13.55 | 1.29           | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 1.29   | 1.29 | 1.29       | 0.00 | 4.52       | 0.00 | 0.00  | 3.23 |                 |       |
| <i>Fusarium solani</i>               | 1.29           | 0.64  | 0.00           | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 0.00   | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 0.64       | 0.00 | 0.00  | 0.00 |                 |       |
| <i>Macrophomina phaseolina</i>       | 0.00           | 20.65 | 9.68           | 0.00 | 0.00      | 9.68 | 0.00   | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 0.00  | 0.00 |                 |       |
| <i>Penicillium</i> spp.              | 0.00           | 0.00  | 4.52           | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 0.00   | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 0.64       | 0.00 | 0.00  | 0.00 |                 |       |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp.            | 0.00           | 0.00  | 0.00           | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 0.00   | 0.00 | 0.64       | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 0.00  | 0.00 |                 |       |
| <i>Trichoderma</i> sp.               | 0.00           | 2.58  | 2.58           | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 0.00   | 0.00 | 0.00       | 0.00 | 1.93       | 0.64 | 0.64  | 0.00 |                 |       |

<sup>z</sup>€: plantas con síntomas, €: plantas asintomáticas, Nd: no dato, no se conoce la variedad. / <sup>z</sup>€: plants with symptoms, €: asymptomatic plants, Nd: no data, the variety is not know.

La secuenciación de la región ITS mostró que los morfotipos de *Fusarium* se ubicaron en las unidades taxonómicas operativas *F. fujikuroi*, *F. solani* y *F. oxysporum*. El hongo clasificado preliminarmente como *M. phaseolina*, obtuvo un porcentaje de similitud del 100%. Los aislamientos tentativamente definidos como *Penicillium* spp. se clasificaron como *P. crustosum*, *P. simplicissimum*, *Penicillium* sp. y *Talaromyces pinophilus* (Cuadro 3). No se realizó secuenciación del ADN proveniente de *A. rolfsii*, porque las características morfológicas se consideraron suficientes para su identificación, y coincidieron con las descritas por Kamil *et al.* (2020), micelio blanco algodonoso con presencia de fibulas, tanto en planta como en medio de cultivo PDA y, el desarrollo de esclerocios esféricos de

plant and PDA culture medium and the development of spherical sclerotia, approximately 1 mm in size, colored white at the beginning and light brown at maturity.

The species with the highest frequency of isolation, *M. phaseolina*, *F. oxysporum* and *A. rolfsii* (Figure 1), are related to root rot and vascular wilting in common bean plants worldwide (Xue *et al.*, 2015; Yesil and Bastas, 2016; Al-Jaradi *et al.*, 2018; Sendi *et al.*, 2019). In Costa Rica they were reported previously (Echandi, 1967; Araya and Hernández, 2003; Villalobos *et al.*, 2009); however, in no previous investigation was there a morphological identification or any molecular analysis to confirm the identity of the pathogenic agent related to the damage described.

**Cuadro 3. Identificación molecular, porcentaje de similitud, accesión y longitud de la secuencia de ITS de morfotipos recuperados a partir de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con y sin síntomas de marchitez, según región productora y variedad. Regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica. 2017-2020.**

**Table 3. Molecular identification, percentage of similarity, accession and length of the ITS sequence of morphotypes recovered from common bean plants (*Phaseolus vulgaris*) with and without symptoms of wilting, depending on the region of production and the variety. Regions of Huetar Norte and Brunca, Costa Rica. 2017-2020.**

| Identificación                               | % de similitud | Secuencias de referencia disponibles en GenBank | # accesión en GenBank | Longitud de la secuencia (pares de bases) | Región productora | Variedad   | Estado de la planta |
|----------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|-------------------|------------|---------------------|
| <i>Fusarium</i> cf. <i>fujikuroi</i>         | 99.8           | KT192406                                        | MW449097              | 514                                       | Brunca            | IBC302-29  | Con síntoma         |
| <i>Fusarium</i> cf. <i>oxysporum</i>         | 99.5           | MK156682                                        | MW449096              | 503                                       | Brunca            | ALS 0536-6 | Con síntoma         |
| <i>Fusarium</i> cf. <i>solani</i>            | 99.9           | MK817031                                        | MW449094              | 503                                       | Brunca            | Cabécar    | Con síntoma         |
| <i>Macrophomina phaseolina</i>               | 100.0          | MK968305                                        | MW449091              | 536                                       | Huetar Norte      | Guaymí     | Con síntoma         |
| <i>Colletotrichum</i> sp.                    | 99.6           | KX721643                                        | MW449095              | 515                                       | Brunca            | Cabécar    | Sin síntoma         |
| <i>Penicillium</i> aff. <i>crustosum</i>     | 98.3           | KF938410                                        | MW449099              | 489                                       | Brunca            | Cabécar    | Sin síntoma         |
| <i>Penicillium</i> cf. <i>simplicissimum</i> | 99.7           | KM104597                                        | MW449100              | 490                                       | Brunca            | Cabécar    | Sin síntoma         |
| <i>Penicillium</i> sp.                       | 100.0          | KY552262                                        | MW449093              | 537                                       | Brunca            | Nambí      | Sin síntoma         |
| <i>Talaromyces</i> cf. <i>pinophilus</i>     | 99.5           | CP017345                                        | MW449092              | 527                                       | Brunca            | Cabécar    | Sin síntoma         |
| <i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>      | 99.7           | MK387946                                        | MW449098              | 550                                       | Brunca            | Nambí      | Sin síntoma         |



aproximadamente de 1 mm, de coloración blanca al inicio y café claro cuando maduran.

Las especies con mayor frecuencia de aislamiento, *M. phaseolina*, *F. oxysporum* y *A. rolfsii* (Figura 1) están asociadas a pudriciones radicales y marchitez vascular en frijol común alrededor del mundo (Xue *et al.*, 2015; Yesil y Bastas, 2016; Al-Jaradi *et al.*, 2018; Sendi *et al.*, 2019). En Costa Rica fueron reportadas con anterioridad (Echandi, 1967; Araya y Hernández, 2003; Villalobos *et al.*, 2009); sin embargo, en ninguno de los trabajos previos se realizó una identificación morfológica o algún análisis molecular para confirmar la identidad del agente patógeno asociado al daño descrito.

Los síntomas observados en campo para la pudrición carbonosa provocada por *M. phaseolina*, coincidieron con los reportados por Sun *et al.* (2019) para esta patología e incluyeron clorosis, marchitez y muerte de plantas adultas con hojas completamente deshidratadas unidas al tallo (Figura 2 A y D), así como decoloración y pudrición en la base del tallo. De acuerdo con Araya y Hernández (2003), esta especie se presenta con frecuencia en la región Huetar Norte, no así en la región Brunca, comportamiento que se repitió en este estudio (Cuadro 1).

Durante el ciclo productivo del 2019 en la región Huetar Norte se presentaron condiciones de sequía y altas temperaturas, propias de un año bajo influencia del fenómeno del Niño (Fernández y Ramírez, 1991; Alvarado, 2019), que favorecieron o predispusieron la infección por *M. phaseolina* (Dhingra y Chagas, 1981), debido a las alteraciones fisiológicas que sufre el hospedante, como reducción de la tasa de transpiración y la conductancia estomática (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). Estas condiciones explicarían porque solo en ese año fue posible recuperar dicho patógeno de plantas marchitas en esa región; mientras que, en los demás años de muestreo no fue aislado. Al respecto, en 2018 se

The symptoms observed on the field for symptoms of carbon rot caused by *M. phaseolina* coincided with those reported for Sun *et al.* (2019) for this pathology and included chlorosis, wilting and the death of adult plants with completely dehydrated leaves attached to the stem (Figure 2 A and D), as well as discoloration and rotting on the base of the stem. According to Araya and Hernández (2003), this species is commonly found in the region of Huetar Norte, but not in the region of Brunca, a behavior which was also displayed in this study (Table 1).

During the 2019 productive cycle, the region of Huetar had drought conditions and high temperatures, typical of a year under the influence of *El Niño* (Fernández and Ramírez, 1991; Alvarado, 2019), which favored or predisposed infection with *M. phaseolina* (Dhingra and Chagas, 1981), due to the physiological alterations undergone by the host, such as a reduction in the transpiration rate and stomatal conductance (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). These conditions would explain why, in that year alone, it was possible to recover this pathogen from wilted plants in the region and in the other sampling years it was not isolated. In this regard, 2018 had rain conditions, typical of a year under the influence of the *La Niña* phenomenon (Fernández and Ramírez, 1991; Alvarado, 2018) and 2017 and 2020 were neutral years, according to the National Weather Institute of Costa Rica (Alvarado, 2017; Alvarado, 2020).

On the other hand, *F. oxysporum* was isolated from seedlings and adult plants with long and sunken lesions and reddish in color (Figure 2 B and E). The symptoms on the field were distributed in patches, although they were occasionally found at random. The damages observed agreed with those indicated for wilting by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) in several investigations: plants with delayed growth, gradual yellowing, defoliation and

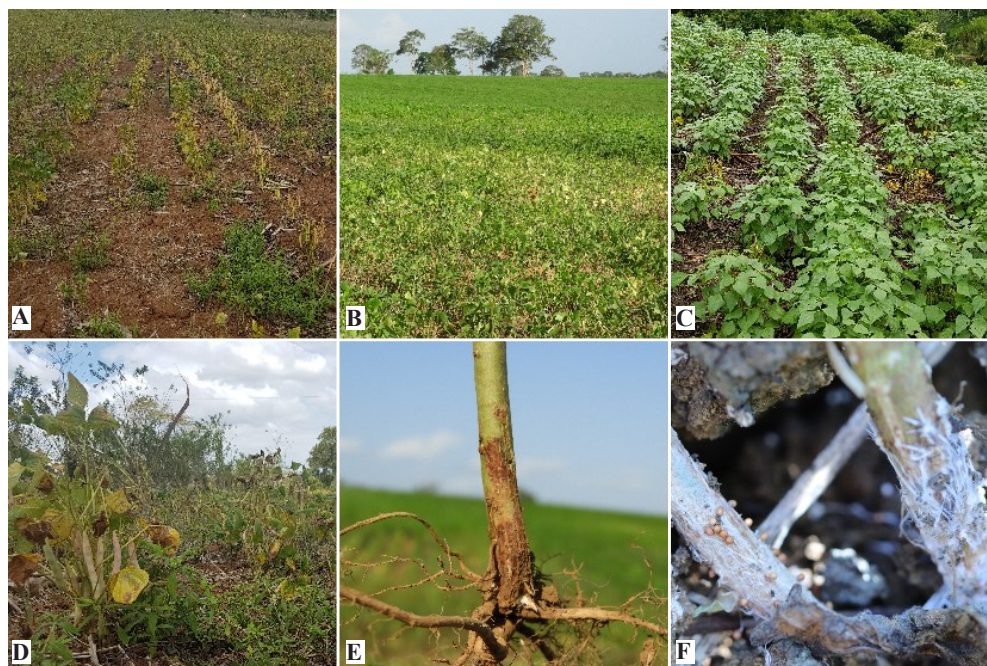


Figura 2. Plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con síntomas de marchitez de las que se aislaron A) y D) *Macrophomina phaseolina*; B) y E) *Fusarium oxysporum*; C) y F) *Athelia rolfsii*. Regiones Brunca y Huetar Norte, Costa Rica. 2018-2020.

Figure 2. Common bean plants (*Phaseolus vulgaris*) with signs of wilting, from which A) and D) *Macrophomina phaseolina*; B) and E) *Fusarium oxysporum*; C) and F) *Athelia rolfsii* were isolated. Regions of Brunca and Huetar Norte, Costa Rica. 2018-2020.

tuvieron condiciones lluviosas propias de un año bajo el fenómeno de la Niña (Fernández y Ramírez, 1991; Alvarado, 2018), y 2017 y 2020 fueron años neutros, según el Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (Alvarado, 2017; Alvarado, 2020).

Por otro lado, *F. oxysporum* se aisló a partir de plántulas y plantas adultas, de lesiones longitudinales y hundidas, de coloración rojiza (Figura 2 B y E). Los síntomas en campo se distribuyeron en parches, aunque en ocasiones se encontraron de forma aleatoria. Los daños observados concordaron con los indicados para marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) en varias investigaciones: plantas con retardo de crecimiento, amarillamiento gradual, defoliación y decoloración de tejidos vasculares de raíces y tallos (Kendrick y Snyder,

discoloration of vascular tissues in roots and stems (Kendrick and Snyder, 1942; Schwartz, 1989; Saremi *et al.*, 2011; Edel-Hermann and Lecomte, 2019). Wilting by Fop is considered one of the main diseases in common bean plants worldwide (Xue *et al.*, 2015).

Both *Macrophomina* and *Fusarium* can be transmitted by seeds. The latter can be found on the surface and underneath it, particularly in the cotyledons (Kendrick, 1934; Singh and Schwartz, 2010; Marcenaro and Valkonen, 2016). In this study, these pathogens were isolated from asymptomatic plants, which may indicate that they are latent in the seeds, as in findings by Parsa *et al.* (2016), who found both fungi in an endophytic form in healthy and disinfected seeds.

1942; Schwartz, 1989; Saremi *et al.*, 2011; Edel-Hermann y Lecomte, 2019). La marchitez por Fop se considera una de las principales enfermedades del frijol común a nivel mundial (Xue *et al.*, 2015).

Tanto *Macrophomina* como *Fusarium* pueden ser transmitidos por semilla. El último, puede localizarse en la superficie y en el interior, especialmente en los cotiledones (Kendrick, 1934; Singh y Schwartz, 2010; Marcenaro y Valkonen, 2016). En esta investigación se aislaron estos patógenos de plantas asintomáticas, lo que podría indicar que se encuentran latentes en la semilla, al igual que lo encontrado por Parsa *et al.* (2016), quienes encontraron estos dos hongos de forma endófito en semillas sanas y desinfectadas.

La enfermedad que provoca *Athelia rolfsii* en frijol es conocida mundialmente como añublo sur-reño, los síntomas incluyen marchitez y lesiones en la base de la planta, que gradualmente la desecan. Además, frecuentemente, se presenta el desarrollo de micelio grueso, blanco y algodonoso en la lesión, con presencia de esclerocios esféricos de coloración café (Abawi y Pastor-Corrales, 1990; Mahadevakumar *et al.*, 2015), síntomas y signos observados en esta investigación (Figura 2 C y F). *Athelia rolfsii* se obtuvo solo de plantas adultas con colapso completo y al igual que *Fusarium*, presentó distribución agregada.

A partir de los síntomas observados en campo se aislaron los hongos comúnmente descritos en frijol para esas patologías. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de patogenicidad para corroborar que son los causantes de las infecciones. Adicionalmente, se debe realizar una identificación molecular más precisa, de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Talaromyces*, con marcadores como EF-1 $\alpha$ , rpb2 y el gen de la  $\beta$ -tubulina, especialmente, para resolver con mayor exactitud cuáles especies o formas especiales están presentes. Sobre todo, si se toma en cuenta lo hallado por Marcenaro y

The disease caused by *Athelia rolfsii* in the bean plant is known worldwide as southern blight, and its symptoms include wilting and lesions on the base of the plant, which gradually dry it out. Additionally, a development of thick, white, cottonlike mycelia frequently appears in the lesion, along with brown, spherical sclerotia (Abawi and Pastor-Corrales, 1990; Mahadevakumar *et al.*, 2015), all of which are symptoms and signs observed in this investigation (Figure 2 C and F). *Athelia rolfsii* was only obtained from adult plants with a complete collapse and, as in the case of *Fusarium*, it displayed aggregated distribution.

From the symptoms observed on the field, we isolated the fungi described in beans for those pathologies. However, pathogenicity tests must be performed to confirm that they are the cause of the infections. In addition, a more accurate molecular identification is necessary, with markers such as EF-1 $\alpha$ , rpb2 and the gene of  $\beta$ -tubulin, especially in the genera *Fusarium*, *Trichoderma* and *Talaromyces*, to find exactly what species or special forms are present. This is particularly true when considering the findings by Marcenaro and Valkonen (2016), Edel-Hermann and Lecomte (2019) and Guido-Monge (2020), who reported the presence of other species of *Fusarium* related to the common bean; as well as reports by Otadoh (2011), Carvalho *et al.* (2014) and Abdel-Rahim and Abo-Elyousr (2018), who point out that *Trichoderma* and *Talaromyces* may be biocontrol agents.

The advanced commercial varieties and experimental lines sampled were susceptible to these pathogens. Due to their potential to cause losses in yields (Singh and Schwartz, 2010), the genetic breeding program for bean in Costa Rica must pay more attention to these pathologies.

This investigation corroborated, through isolation and molecular identification based on ITS, the identity of the fungi related to the wilting

Valkonen (2016), Edel-Hermann y Lecomte (2019) y Guido-Monge (2020), que reportan la presencia de otras especies de *Fusarium* relacionadas con el frijol común. Así como, lo documentado por Ota-doh (2011), Carvalho *et al.* (2014) y Abdel-Rahim y Abo-Elyousr (2018), que indican que *Trichoderma* y *Talaromyces* podrían ser agentes de biocontrol.

Las variedades comerciales y líneas experimentales avanzadas muestreadas fueron susceptibles a estos patógenos. Por el potencial de causar pérdidas en rendimiento que éstos tienen (Singh y Schwartz, 2010), el programa de mejoramiento genético de frijol en Costa Rica debe poner mayor atención a estas patologías.

Esta investigación corroboró mediante el aislamiento e identificación molecular basada en ITS, la identidad de los hongos asociados a la marchitez del frijol en las principales zonas productoras de Costa Rica, lo que permite desarrollar mejores estrategias de combate de estos patógenos. Se sugiere realizar trabajos de pruebas de patogenidad e identificación molecular con marcadores como EF-1 $\alpha$ , rpb2 y el gen de la  $\beta$ -tubulina.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI), proyecto F14-17, y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR), proyecto B7514, por el financiamiento parcial de esta investigación; al Centro de Investigación en Protección de Cultivos (UCR) por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología, y al Ing. Álvaro Ulate Hernández de la Oficina Nacional de Semillas, por su apoyo en la recolección de muestras.

#### LITERATURA CITADA

Abawi GS and Pastor-Corrales MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies. CIAT. Cali, Colombia.

of bean plants in the main areas of production in Costa Rica, which helps develop better strategies to manage these pathogens. We suggest performing pathogenicity tests and molecular identification with markers such as EF-1 $\alpha$ , rpb2 and the  $\beta$ -tubulin gene.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the Foundation for the Promotion of Research and Transfer of Agricultural Technology of Costa Rica (FITTACORI), project F14-17, and the Vice-rectory of Research of the University of Costa Rica (UCR), project B7514, for the partial funding of this investigation; to the Research Center in Crops Protection (UCR) for allowing the use of the Phytopathology Laboratory facilities, and to Ing. Álvaro Ulate Hernández of the National Seed Office, for his help in the recollection of samples.

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

- 114 p. https://books.google.ca/books?id=YxGqzLSYtcMC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&hl=es#v=onepage&q&f=false
- Abdel-Rahim IR and Abo-Elyousr KAM. 2018. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. Microbiological Research 212-213:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.004>
- Al-Jaradi A, Al-Mahmooli I, Janke R, Maharachchikumbura S, Al-Saady N and Al-Sadi AM. 2018. Isolation and identification of pathogenic fungi and oomycetes associated with beans and cowpea root diseases in Oman. PeerJ-Life and Environment 6: e6064. <https://doi.org/10.7717/peerj.6064>
- Alvarado, LF. 2017. Informe 10. Boletín del ENOS No. 101. Fase actual: Neutra. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 2p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/431236/%23%20101>
- Alvarado, LF. 2018. Informe 3. Boletín del ENOS No. 112. Fase actual: La Niña. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 4p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/450551/%23%20112>
- Alvarado, LF. 2019. Informe 10. Boletín del ENOS No. 119. Fase actual: El Niño. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 5p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/470467/%23119>
- Alvarado, LF. 2020. Informe marzo 2020. Boletín del ENOS No. 129. Fase actual: Neutra. Instituto Meteorológico

- Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 2p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/486374/%23129>
- Araya CM y Hernández JC. 2003. Distribución agroecológica de enfermedades del frijol en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 68: 26-33. <http://hdl.handle.net/11554/6067>
- Araya CM y Hernández JC. 2006. Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). San José, Costa Rica. 44p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H20-5247.pdf>
- Carvalho DC, Lobo-Junior M, Martins I, Inglis PW and Mello SCM. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology* 39(5): 384-391. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762014000500005>
- Dhingra OD and Chagas D. 1981. Effect of soil temperature, moisture, and nitrogen on competitive saprophytic ability of *Macrophomina phaseolina*. *Transactions of the British Mycological Society* 77(1): 15-20. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(81\)80173-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(81)80173-8)
- Echandi E. 1967. Amarillamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli*. *Turrialba* 17(4): 409-411.
- Edel-Hermann V and Lecomte C. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* 109(4): 512-530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
- Fernández W y Ramírez P. 1991. El Niño, la Oscilación del Sur y sus efectos en Costa Rica: una revisión. *Tecnología en Marcha* 11(1): 3-10. https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/2631
- Guido-Monge, AZ. 2020. Prevalencia de especies micotoxigénicas de *Fusarium* en frijol negro producido en Costa Rica y determinación de su capacidad toxigénica. [Tesis de Licenciatura sin publicar]. Universidad de Costa Rica.
- Hernández-Fonseca JC. 2009. Zonas de cultivo y épocas de siembra. Pp:18. In: Hernández JC y Ramírez L (eds.). *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris)*. Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). San José, Costa Rica. 80p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9533.pdf>
- Hernández-Fonseca JC y Araya-Villalobos R. 2009. Cultivo. Pp:19-26. In: Hernández JC y Ramírez L (eds.). *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris)*. Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). San José, Costa Rica. 80p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9533.pdf>
- Hernández-Fonseca JC y Chaves-Barrantes N. 2016. Nambí. Variedad de frijol resistente a la sequía terminal. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) y Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa. Alajuela, Costa Rica. Plegable. 6p.
- Hernández JC, Chaves NF, Araya R y Beebe S. 2018. "Diquís", variedad de frijol común rojo brillante. *Agronomía Costarricense* 42(1): 127-136. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v42n01_127.pdf
- Hofstetter V, Buyck B, Eyssartier G, Schnee S and Gindro K. 2019. The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Diversity* 96: 243-284. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00428-3>
- Kamil D, Bahadur A, Debnath P, Kumari A, Choudhary SP and Prameeladevi T. 2020. First report of *Athelia rolfsii* causing stem rot disease on Vasaka (*Justicia adhatoda*). *Australasian Plant Disease Notes* 15(1): 33. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00402-y>
- Kendrick JB. 1934. Seed transmission of fusarium yellows of beans. *Phytopathology* 24(10): 1139.
- Kendrick JB and Snyder WC. 1942. *Fusarium* yellows of beans. *Phytopathology* 32(11): 1010-1014.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. Morphological characters. Pp:111-119. In: Leslie JF and Summerell BA. (eds.). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.
- López R, Gómez S, De la Rosa S and Garrido E. 2017. The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology* 26: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.11.004>
- Mahadevakumar S, Tejaswini GS, Janardhana GR and Yadav V. 2015. First report of *Sclerotium rolfsii* causing southern blight and leaf spot on common bean (*Phaseolus vulgaris*) in India. *Plant Disease* 99(9): 1280-1280. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-15-0125-pdn>
- Marcenaro D and Valkonen JPT. 2016. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) in Nicaragua. *PLOS ONE* 11(12): e0168662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168662>
- Mayek-Pérez N, García-Espinosa R, López-Castañeda C, Acosta-Gallegos JA and Simpson J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60(4): 185-195. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0388>
- Mendes LW, de Chaves MG, Fonseca MC, Mendes R, Raaijmakers JM and Tsai SM. 2019. Resistance breeding of common bean shapes the physiology of the rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology* 10: 2252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02252>
- Méndez-Aguilar R, Reyes-Valdés MH y Mayek-Pérez N. 2013. Avances y perspectivas sobre el mapeo genético de la resistencia a las pudriciones de la raíz en frijol común. *Phyton* 82:215-226. http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/MENDEZ_AGUILAR.pdf
- Mueller G, Bills G and Foster M. 2004. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. London, UK. 777p.
- Otadoh JA, Okoth SA, Ochanda J and Kahindi JP. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Tropical and subtropical agroecosystems* 13(1): 99-107. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v13n1/v13n1a15.pdf>
- Parsa S, García-Lemos AM, Castillo K, Ortiz V, López-Lavalle LAB, Braun J and Vega FE. 2016. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Fungal Biology* 120(5): 783-790. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.017>

- Rodríguez-González S y Fernández-Rojas SE. 2015. Prácticas culinarias asociadas al consumo de frijoles en familias costarricenses. *Agronomía Mesoamericana* 26(1): 145-151. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16937>
- Saremi H, Amiri ME and Ashrafi J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. *African Journal of Biotechnology* 10(66): 14954-14961. <https://doi.org/10.5897/AJB11.258>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Lesvesque CA, Chen W and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoonhoven A y Voyses O. 1994. El frijol común en América Latina y sus limitaciones. Pp:39-66. *In: Pastor-Corrales M y Schwartz HF (eds.). Problemas de producción del frijol en los trópicos*. 2 ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 805p. <https://core.ac.uk/download/pdf/132664941.pdf>
- Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W and Kendrick B. 2011. The genera of Hyphomycetes. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 997 p.
- Sendi Y, Romdhane SB, Mhamdi R and Mrabet M. 2019. Diversity and geographic distribution of fungal strains infecting field-grown common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 153(3):947-955. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01612-y>
- Singh SP and Schwartz HF. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science* 50:2199-2223. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.03.0163>
- Sun SL, Zhu ZD, Duan CX, Zhao P, Sun F, Deng D and He YH. 2019. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on faba bean in China. *Plant Disease* 103(6): 1415. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1660-PDN>
- Schwartz HF. 1989. Occurrence of fusarium wilt of beans in Colorado. *Plant Disease* 73(6): 518. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0518D>
- Villalobos JL, Cárdenas FA y Cordero JM. 2009. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Servicio Fitosanitario del Estado. Diagnóstico Fitosanitario. San José, Costa Rica. 118 p.
- White T, Bruns S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. *In: Innis M, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York. 482p.
- Xue R, Wu J, Zhu Z, Wang L, Wang X, Wang S and Blair MW. 2015. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *PLOS ONE* 10(6): e0127698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127698>
- Yesil S and Bastas KK. 2016. Genetic variability of *Macrophomina phaseolina* isolates from dry beans in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 4(4):305. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i4.305-312.572>

Biocontrol of damping-off of zucchini squash seedlings with *Bacillus subtilis* QST 713

Biocontrol del ahogamiento de plántulas de calabacita con *Bacillus subtilis* QST 713

Alma Rosa Solano-Báez, Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur No. 1103, Barrio de Santiago, Puebla, Puebla, CP 72410, México; **Santos Gerardo Leyva-Mir**, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; **Rosalía Núñez-Pastrana**, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Camino Peñuela-Amatlán s/n, Amatlán de los Reyes, Veracruz, CP 94945, México; **Andrés Quezada-Salinas**, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca Calle Centenario, Tecámac de Felipe de Villanueva, Estado de México, CP 55740, México; **Guillermo Márquez-Licona***, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle CeProBi No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México.

*Autor para correspondencia: gmarquezl@ipn.mx

Recibido: 06 de Enero, 2021.

Aceptado: 13 de Febrero, 2021.

Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG, Núñez-Pastrana R, Quezada-Salinas A and Márquez-Licona G. 2021. Biocontrol of damping-off of zucchini squash seedlings with *Bacillus subtilis* QST 713. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 302-313.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-2>

Primera publicación DOI: 09 de Marzo, 2021.

First DOI publication: March 09, 2021.

Resumen. *Bacillus subtilis* presenta actividad antagónica contra fitopatógenos. En el presente estudio, se identificaron los hongos asociados al ahogamiento en plántulas de calabacita y se evaluó la efectividad de la cepa QST 713 de *B. subtilis* ante la infección combinada de los hongos aislados. Los

Abstract. *Bacillus subtilis* exhibits antagonistic activity against plant pathogens. In the present study, the fungi associated with damping off in zucchini squash seedlings were identified and the efficacy of *B. subtilis* strain QST 713 was evaluated against the combined infection of the isolated fungi. The pathogens were isolated from zucchini squash seedlings with symptoms of damping off. Seedlings of zucchini squash var. Gray zucchini were inoculated with propagules of three pathogens at a concentration of 4×10^5 CFU of each pathogen. The effectiveness of *B. subtilis* ($2, 4$ y 6×10^7 UFC mL^{-1}) was evaluated and compared with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive and curative). The incidence was assessed at three, six, nine and 12 days (dai). Three fungi out of 100 isolates were

patógenos se aislaron de plántulas de calabacita con síntomas de ahogamiento. Se inocularon plántulas de calabacita var. Grey zucchini con propágulos de tres patógenos a una concentración de 4×10^5 UFC de cada patógeno. Se evaluó la efectividad de *B. subtilis* (2, 4 y 6×10^7 UFC mL⁻¹) y se comparó con metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventiva y curativa). La incidencia se evaluó a los tres, seis, nueve y 12 días (ddi). Se aislaron e identificaron tres hongos de 100 aislamientos: *Phytophthora capsici* (62%), *Rhizoctonia solani* (26%) y *Fusarium oxysporum* (12%). Se observó la eficiencia de *B. subtilis*, con una reducción en la incidencia de la enfermedad conforme se incrementó la concentración. Doce días después de la inoculación, la incidencia del ahogamiento en los tratamientos con *B. subtilis* varió de 18.3 a 41%. El tratamiento de *B. subtilis* (6×10^7 UFC mL⁻¹) fue estadísticamente igual a metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo). La cepa QST 713 de *B. subtilis* controló un 81.7% el ahogamiento de plántulas de calabacita, aplicada de manera preventiva a una concentración de 6×10^7 UFC mL⁻¹.

Palabras clave: *Cucurbita pepo*, plántulas, metil tiofanato, propamocarb clorhidrato.

La calabacita (*Cucurbita pepo*) es una de las principales especies de cucurbitáceas (Zitter *et al.*, 2004). La producción de calabacita está limitada por agentes bióticos y abióticos durante todo su ciclo de cultivo, siendo la etapa de plántula una de las más críticas. Existen numerosos patógenos que pueden afectar las semillas y plántulas, causando ahogamiento en preemergencia o postemergencia. Los agentes causales más comunes del ahogamiento de plántulas en cucurbitáceas son: *Fusarium oxysporum* (Vakalounakis y Chalkias, 2004), *Phytophthora capsici* (Hausbeck y Lamour, 2004), *Rhizoctonia*

isolated and identified: *Phytophthora capsici* (62%), *Rhizoctonia solani* (26%) and *Fusarium oxysporum* (12%). The efficiency of *B. subtilis* was observed, with a reduction in the incidence of the disease as the concentration was increased. Twelve days after inoculation, the incidence of damping off in *B. subtilis* treatments ranged from 18.3 to 41%. The *B. subtilis* treatment (6×10^7 CFU mL⁻¹) was statistically equal to methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative). The strain QST 713 of *B. subtilis* controlled 81.7% the damping off of zucchini squash seedlings, applied preventively at a concentration of 6×10^7 CFU mL⁻¹.

Key words: *Cucurbita pepo*, seedlings, thiophanate-methyl, propamocarb hydrochloride.

Zucchini squash (*Cucurbita pepo*) is one of the main cucurbitaceae species (Zitter *et al.*, 2004). Its production is limited by biotic and abiotic agents during the whole cropping cycle, being the seedling stage one of the most critical. There are numerous pathogens that affect seed and seedlings and cause pre-emergence or post-emergence damping off. The most common causal agents of seedlings damping off in cucurbitaceae are *Fusarium oxysporum* (Vakalounakis and Chalkias, 2004), *Phytophthora capsici* (Hausbeck and Lamour, 2004), *Rhizoctonia solani* (Scheuerell *et al.*, 2005) and *Pythium* spp. (Deadman *et al.*, 2002; Scheuerell *et al.*, 2005). In the past two decades, the use of synthetic pesticides has been considerably reduced because of the development of new control strategies such as biopesticides (Ongena and Jacques, 2007). One of the species most used as bioplagueicide is *Bacillus subtilis*, because it produces antibiotics, lipoproteins and hydrolytic enzymes which confer antifungal activity, making it an excellent biological control agent of phytopathogens. Specifically,

solani (Scheuerell *et al.*, 2005) y *Pythium* spp. (Deadman *et al.*, 2002; Scheuerell *et al.*, 2005). En las dos últimas décadas, el uso de plaguicidas sintéticos ha disminuido considerablemente debido al desarrollo de nuevas estrategias de control como los bioplaguicidas (Ongena y Jacques, 2007). Una de las especies más usadas como bioplaguicida es *Bacillus subtilis*, debido a que ésta produce antibióticos, lipoproteínas y enzimas hidrolíticas, que le confieren actividad antifúngica, convirtiéndola en un excelente agente de control biológico de fitopatógenos (Ongena y Jacques, 2007). De forma específica, se ha reportado su actividad sobre organismos que inducen ahogamiento de plántulas, y sus efectos benéficos sobre las plántulas tratadas (Cavaglieri *et al.*, 2005; Sharma y Sharma, 2008). *B. subtilis* produce tres familias de polipéptidos cíclicos (surfactinas, iturinas y fengicinas) relacionadas con su actividad antagónica contra bacterias, hongos y oomicetes. Estas lipoproteínas también están asociadas a una mayor capacidad de colonización de las raíces vegetales de la cepa bacteriana que las produce, e intervienen en la estimulación de la respuesta de defensa de la planta (Ongena y Jacques, 2007; Villareal-Delgado *et al.*, 2017). Además de los polipéptidos cíclicos, *B. subtilis* produce compuestos antimicrobiales, que le confieren una mayor capacidad para el control de fitopatógenos (Hamdache *et al.*, 2011; Wise *et al.*, 2012). Por lo anterior, *B. subtilis* es una alternativa promisoriosa para el control biológico de fitopatógenos (Falardeau *et al.*, 2013; Khedher *et al.*, 2015). Hasta el momento, los datos publicados sobre la efectividad de la cepa QST 713 de *B. subtilis* para el control combinado de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* son escasos. Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo identificar morfológicamente a los agentes causales asociados al ahogamiento en plántulas de calabacita y determinar la efectividad de *B. subtilis* cepa QST 713 sobre la incidencia de la enfermedad

its activity has been reported in organisms which induce seedling damping off, and its beneficial effects on treated seedlings (Cavaglieri *et al.*, 2005; Sharma and Sharma, 2008). *B. subtilis* produces three families of cyclic polypeptides (surfactins, iturines and fengycins) involved in its antagonistic activity against bacteria, fungi, and oomycetes. These lipoproteins are also associated with a greater capacity to colonize the plant roots of the bacterial strain that produces them and are involved in the stimulation of the plant's defense response (Ongena and Jacques, 2007; Villareal-Delgado *et al.*, 2017). In addition to cyclic polypeptides, *B. subtilis* produces antimicrobial compounds which increase its capacity to control phytopathogens (Hamdache *et al.*, 2011; Wise *et al.*, 2012). Based on this, *B. subtilis* is a promising alternative for the biological control of phytopathogens (Falardeau *et al.*, 2013; Khedher *et al.*, 2015). So far, the data published on the effectiveness of *B. subtilis* strain QST 713 for the combined control of *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* are scarce. Therefore, the objective of this research was to morphologically identify the causal agents associated with damping off in zucchini squash seedlings and determine the effectiveness of *B. subtilis* strain QST 713 on the incidence of the disease produced by the combined inoculation of the isolated fungi.

During the 2019 spring-summer cycle, zucchini squash (*Cucurbita pepo*) seedlings with damping off symptoms were collected in Cuautla, Morelos. The fungi associated with the symptoms were isolated from root and stem cuts, as described by Ayala-Armenta *et al.* (2020). The morphological characterization was conducted under a compound microscope CX31RBSFA (Olympus®, Japan) at 40X, where 50 reproductive structures of each isolate were measured. The molecular identification was done based on specialized taxonomic keys (Leslie and Summerell, 2006; Sneh *et al.*, 1991; Erwin and

producida por la inoculación combinada de los hongos aislados.

En el ciclo primavera-verano 2019, se colectaron plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) con síntomas de ahogamiento en Cuautla, Morelos. El aislamiento de los hongos asociados a los síntomas se realizó a partir de cortes de raíces y tallos, de acuerdo con lo descrito por Ayala-Armenta *et al.* (2020). La caracterización morfológica se realizó a 40X en un microscopio compuesto CX31RBSFA (Olympus®, Japón), donde se midieron 50 estructuras reproductivas de cada aislado. La identificación se realizó con base en claves taxonómicas especializadas (Leslie y Summerell, 2006; Sneh *et al.*, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996). Para corroborar la patogenicidad de los aislados se realizaron los Postulados de Koch usando plántulas sanas de calabacita. La prueba de patogenicidad se realizó dos veces seleccionando el aislamiento más virulento de cada especie.

Para la evaluación de *B. subtilis* contra los hongos aislados, se usaron semillas de calabacita var. Grey zucchini. El tratamiento fungicida presente en las semillas se eliminó de acuerdo con lo descrito por Márquez-Licona *et al.* (2018). Siete días después de la siembra, las plántulas emergidas se trasplantaron a vasos de poliuretano de 500 mL, que contenían sustrato estéril a base de Peat Moss y agrolita (75:25 v/v). Los tratamientos evaluados consistieron en tres concentraciones de la cepa QST 713 de *B. subtilis* (Serenade ASO®) (2, 4 y 6×10^7 UFC mL⁻¹) y metil tiofanato + propamocarb clorhidrato aplicado de manera preventiva y curativa (Cuadro 1). Se determinó la incidencia del ahogamiento de plántulas de calabacita causado por la infección combinada de los hongos aislados y en condiciones de invernadero (24 °C y 70% HR). La evaluación de los tratamientos se realizó por duplicado. La viabilidad del producto comercial se determinó sembrando una alícuota del mismo en cua-

Ribeiro, 1996). To confirm the pathogenicity of the isolates, the Koch's postulates were followed using healthy squash seedlings. The pathogenicity test was conducted twice selecting the most virulent isolate of each species.

To evaluate *B. subtilis* against the isolated fungi, seeds of zucchini squash Grey var. were used. The fungicide treatment on the seeds was eliminated as described by Márquez-Licona *et al.* (2018). Seven days after planting, the emerging seedlings were transplanted to 500 mL polyurethane cups containing Peat Moss and agrolite sterile substrate (75:25 v/v). The evaluated treatments consisted of three concentrations of *B. subtilis* QST 713 strain (Serenade ASO®) (2, 4 and 6×10^7 UFC mL⁻¹) and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride, which were applied preventively and curatively (Table 1). The incidence of damping off caused by the combined infection of the isolated fungi and under greenhouse conditions was determined using zucchini squash seedlings (24 °C and 70% HR). The treatments were evaluated in duplicate. The viability of the commercial product was determined by placing an aliquot of the product in four Petri dishes containing PDA medium. The Petri dishes were incubated in darkness at 36 °C for 48 h. The viability evaluation was made in duplicate. Inoculum was increased for each pathogen in specific culture mediums (SNA, V8 Agar and PDA). The inoculum load of each of the pathogens applied per plant was adjusted at a concentration of 4×10^5 UFC using a hemocytometer (Marienfeld®). The inoculation of the pathogens was made three days after transplanting. The biological product based on *B. subtilis* was applied twice to zucchini squash seedlings, the first to the transplanted seedlings, and the second six days after transplanting; in both cases, 5 mL of the suspension were applied at the seedlings neck. The preventive chemical treatment was applied when the seedlings were

Cuadro 1. Tratamientos evaluados para el control del ahogamiento de plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) bajo condiciones de invernadero.
Table 1. Evaluation of treatments to control damping off in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) under greenhouse conditions.

| Tratamiento | Concentración | Inóculo ^z |
|---|--|----------------------|
| Testigo inoculado | Sin tratamiento | Inoculado |
| <i>B. subtilis</i> ^y | 2×10 ⁷ UFC mL ⁻¹ | Inoculado |
| <i>B. subtilis</i> ^y | 4×10 ⁷ UFC mL ⁻¹ | Inoculado |
| <i>B. subtilis</i> ^y | 6×10 ⁷ UFC mL ⁻¹ | Inoculado |
| Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (P) | 105 ppm + 868 ppm | Inoculado |
| Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (C) | 105 ppm + 868 ppm | Inoculado |
| Testigo absoluto | Sin tratamiento | Sin inoculación |

^y Cepa QST 713 = Serenade ASO®. ^z *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* aplicando 4×10⁵ UFC de cada uno por planta. P: tratamiento preventivo. C: tratamiento curativo. / ^y Strain QST 713 = Serenade ASO®. ^z *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* applying 4×10⁵ UFC of each per plant. P: preventive treatment. C: curative treatment.

tro cajas Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron en oscuridad a 36 °C por 48 h. La evaluación de la viabilidad se realizó por duplicado. El inóculo se incrementó en medios de cultivo específicos para cada patógeno (SNA, V8 Agar y PDA). La carga de inóculo de cada patógeno aplicado por planta, se ajustó a una concentración de 4×10⁵ UFC usando un hemacitómetro (Marienfeld®). La inoculación de los patógenos se realizó tres días después del trasplante. El producto biológico a base de *B. subtilis* se aplicó dos veces en las plántulas de calabacita, la primera al trasplante y la segunda seis días después del trasplante, depositando en ambos casos 5 mL de la suspensión al cuello de la plántula. El tratamiento químico preventivo se aplicó al momento del trasplante y el curativo a 72 h después de la inoculación de los patógenos depositando 5 mL de la solución al cuello de la plántula. Para determinar la efectividad de los tratamientos sobre la enfermedad, la incidencia del ahogamiento en las plántulas de calabacita se registró cada 24 h, a partir del momento de la inoculación de los patógenos. El análisis estadístico incluyó las evaluaciones a los tres, seis, nueve y 12 días. La unidad experimental constó de 100 plántulas, los datos

transplanted, and the curative treatment 72 h after the pathogens were inoculated, for which 5 mL of the solution were applied to the seedlings neck. To determine the effectiveness of the treatments on the disease, the damping off incidence in the seedlings was measured every 24 h, starting at the time when the pathogens were inoculated. The statistical analysis included evaluations at three, six, nine and 12 days. The experimental unit consisted of 100 seedlings, and the obtained data were analyzed using a randomized complete block design with four replications per treatment. The data were subjected to an analysis of variance and comparison of multiple means using the Tukey's honest significant difference method at a significance level of 5%, and SAS for Windows v. 9.4 (SAS® Systems). The phytotoxicity evaluation of the treatments was made using the percentage scale proposed by the European Weed Research Society (<https://www.ewrs.org/>). To confirm the presence of the pathogens that were inoculated in the diseased plants, re-isolations were made in PDA culture medium. At the end of the experiment, the surviving plants were kept under observation for another 14 days.

obtenidos se analizaron con base al modelo de un diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias mediante el método de la diferencia significativa honesta de Tukey, a un nivel de significancia del 5%, usando el software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4. La evaluación de la fitotoxicidad de los tratamientos se realizó usando la escala porcentual propuesta por la European Weed Research Society (<https://www.ewrs.org/>). Con el propósito de corroborar la presencia de los patógenos inoculados en las plantas enfermas, se hicieron reaislamientos en medio de cultivo PDA. Al final del experimento, las plantas que sobrevivieron se mantuvieron en observación por 14 días más.

Se obtuvieron 100 aislamientos a partir de las plántulas de calabacita con síntomas de ahogamiento recolectadas en Cuautla, Morelos, donde se identificaron a *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Figura 1) en 62, 26 y 12%, respectivamente. Las pruebas de patogenicidad demostraron que los organismos aislados eran patogénicos. Las plantas inoculadas con *P.*

One-hundred isolates were obtained from zucchini squash seedlings with damping off symptoms collected in Cuautla, Morelos, where *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* (Figure 1) were identified in 62, 26 and 12%, respectively. The pathogenicity tests confirmed that the isolated organisms were pathogenic. The plants inoculated with *P. capsici* showed damping off symptoms four days after inoculation, whereas the plants which were independently inoculated with *F. oxysporum* and *R. solani* showed disease symptoms six days after inoculation. In this research, the symptoms occurred earlier than those reported by Chehri *et al.* (2010), who observed damping off symptoms seven days after inoculating *P. capsici* and *F. oxysporum* in cucurbitaceae. SNA, PDA and V8-Agar juice culture mediums increased the amount of inoculum of *F. oxysporum*, *R. solani* and *P. capsici*, respectively. The *B. subtilis* bacterium strain QST 713 (Serenade ASO®) colonized the Petri dish 48 h after the strain was sown and incubated at 36 °C, thus confirming the viability of the commercial product. The first damping off

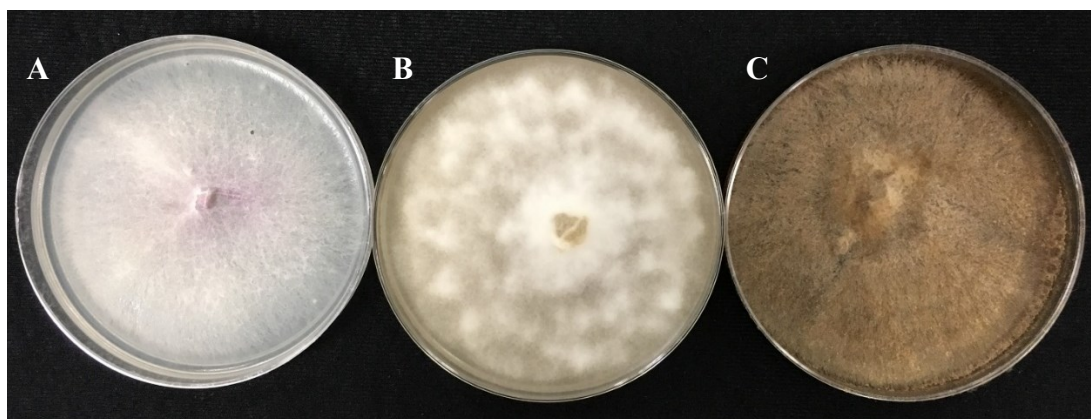


Figura 1. Colonias de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo SNA (A), *Phytophthora capsici* en V8 Agar (B) y *Rhizoctonia solani* en medio PDA (C) aisladas de plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) con síntomas de ahogamiento. Aspecto de las colonias 12 días después de la siembra en medios selectivos.

Figure 1. *Fusarium oxysporum* colonies in SNA culture medium (A), *Phytophthora capsici* in V8 Agar (B) and *Rhizoctonia solani* in PDA medium (C) isolated from zucchini squash seedlings (*Cucurbita pepo*) with damping off symptoms. Appearance of the colonies 12 days after sowing in selective media.

capsici mostraron síntomas de ahogamiento cuatro días después de la inoculación, mientras que las plantas inoculadas de forma independiente con *F. oxysporum* y *R. solani* desarrollaron síntomas de la enfermedad a los seis días después de la inoculación. En la presente investigación, los síntomas se presentaron antes con respecto a lo observado por Chehri *et al.* (2010) quienes observaron síntomas de ahogamiento siete días después de la inoculación de *P. capsici* y *F. oxysporum* en cucurbitáceas. Los medios de cultivo SNA, PDA y Jugo V8-Agar permitieron el incremento de inóculo de *F. oxysporum*, *R. solani* y *P. capsici* respectivamente. La bacteria *B. subtilis* cepa QST 713 (Serenade ASO®) colonizó la caja de Petri 48 h después de la siembra incubándola a 36 °C, demostrándose así la viabilidad del producto comercial. Los síntomas iniciales de ahogamiento en las plantas de calabacita se observaron a las 72 h después de la inoculación. El síndrome concuerda con lo descrito por Koike *et al.* (2007).

La incidencia de la enfermedad presentó una relación directamente proporcional respecto al tiempo transcurrido después de la inoculación. A los 12 días después de la inoculación de los patógenos en las plantas testigo alcanzaron un 100% de incidencia de la enfermedad, mientras que las plantas del testigo absoluto permanecieron sanas. La incidencia promedio de la enfermedad en los tratamientos evaluados se presenta en el Cuadro 2. A los tres días después de la inoculación (ddi) (primera evaluación), el testigo inoculado con el tratamiento metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) y los tratamientos de *B. subtilis* 2×10^7 y 4×10^7 UFC mL⁻¹ presentaron una incidencia de la enfermedad de 2 y 2.5% respectivamente, siendo estadísticamente diferentes respecto al resto de los tratamientos evaluados, los cuales se mantuvieron sanos. En la segunda evaluación (seis ddi), el testigo inoculado alcanzó una incidencia promedio de 60%, mientras

symptoms in zucchini squash plants appeared 72 h after inoculation. The syndrome coincides with the result described by Koike *et al.* (2007).

The disease incidence was directly proportional to the time elapsed after inoculation. Twelve days after the pathogens were inoculated into the control plants, the disease incidence reached 100%, whereas the absolute control plants remained healthy. The average disease incidence in the evaluated treatments is shown in Table 2. Three days after inoculation (dai) (first evaluation), the control inoculated with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) and the treatments based on *B. subtilis* 2×10^7 and 4×10^7 UFC mL⁻¹ showed a disease incidence of 2 and 2.5%, respectively, being statistically different to the rest of the evaluated treatments, which remained healthy. In the second evaluation (six dai), the inoculated control reached 60% average incidence, while the treatments based on *B. subtilis* 2×10^7 and 4×10^7 UFC mL⁻¹ showed 31.8 and 33.8% disease incidence, respectively. The treatments based on *B. subtilis* 6×10^7 UFC mL⁻¹ and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative) were statistically equal, while the treatment with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) and the absolute control were statistically equal, with 0% disease incidence. In the third evaluation (nine dai), the previous tendency was continuous and there was only an increase in the percent of the disease incidence. The inoculated control reached 75% average incidence, while the treatments based on *B. subtilis* 2×10^7 and 4×10^7 UFC mL⁻¹ showed 33.8 and 38.8% disease incidence, respectively. The treatments based on *B. subtilis* 6×10^7 UFC mL⁻¹ and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative) were statistically equal, while the treatment with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) and the absolute control were also statistically equal, with 0% disease

Cuadro 2. Eficiencia de *B. subtilis* en la incidencia del ahogamiento (*F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*) de plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) bajo condiciones de invernadero.**Table 2. Effectiveness of *B. subtilis* in damping off incidence (*F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani*) in zucchini squash seedlings (*Cucurbita pepo*) under greenhouse conditions.**

| Tratamiento | Incidencia promedio de plántulas de calabacita (%) | | | |
|---|--|-------|-------|--------|
| | 3 ddi | 6 ddi | 9 ddi | 12 ddi |
| Testigo inoculado | 2.5a | 60.0a | 75.0a | 100.0a |
| <i>B. subtilis</i> 2×10 ⁷ UFC mL ⁻¹ | 2.5a | 33.8b | 38.8b | 41.3b |
| <i>B. subtilis</i> 4×10 ⁷ UFC mL ⁻¹ | 2.0a | 31.3b | 33.8b | 38.8c |
| <i>B. subtilis</i> 6×10 ⁷ UFC mL ⁻¹ | 0.0b | 14.8c | 16.8c | 18.3d |
| Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (P) | 0.0b | 0.0d | 0.0d | 0.0e |
| Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (C) | 2.5a | 12.0c | 14.8c | 16.3d |
| Testigo absoluto | 0.0b | 0.0d | 0.0d | 0.0e |
| DMS (5%): | 1.3 | 5.5 | 5.8 | 2.37 |
| CV: | 43.5 | 10.9 | 9.8 | 3.31 |

Los valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$), según el método de la diferencia significativa honesta de Tukey. ddi: días después de la inoculación. P: tratamiento preventivo. C: tratamiento curativo. / The intermediate values followed by the same letters in the same column are statistically equal ($P \leq 0.05$), according to Tukey's honest significant difference method. dai: days after inoculation. P: preventive treatment. C: curative treatment.

que los tratamientos a base de *B. subtilis* 2×10⁷ y 4×10⁷ UFC mL⁻¹ presentaron una incidencia de la enfermedad de 31.8 y 33.8% correspondientemente. Los tratamientos de *B. subtilis* 6×10⁷ UFC mL⁻¹ y el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo) fueron estadísticamente iguales, mientras que el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) y el testigo absoluto fueron estadísticamente iguales, con 0% de incidencia de la enfermedad. En la tercera evaluación (nueve ddi), la tendencia anterior se mantuvo solo con un incremento en los porcentajes de incidencia de la enfermedad. El testigo inoculado alcanzó una incidencia promedio de 75%, mientras que los tratamientos de *B. subtilis* 2×10⁷ y 4×10⁷ UFC mL⁻¹ presentaron una incidencia de la enfermedad de 33.8 y 38.8%, respectivamente. Los tratamientos de *B. subtilis* 6×10⁷ UFC mL⁻¹ y el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo) fueron estadísticamente iguales, mien-

incidence. Finally, in the fourth evaluation (12 dai), the inoculated control reached 100% average incidence, while the treatment based on *B. subtilis* 2×10⁷ UFC mL⁻¹ reached 41.3% incidence, and the treatment based on *B. subtilis* 4×10⁷ UFC mL⁻¹ reached 38.8% incidence; however, both treatments (2×10⁷ and 4×10⁷ UFC mL⁻¹) were statistically equal. In the treatments based on *B. subtilis* 6×10⁷ UFC mL⁻¹ and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative) the disease incidence increased 2% compared to the percent obtained in the third evaluation, being statistically equal. Finally, the plants treated with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) remained healthy, this is, with 0% disease incidence.

The results of the effectiveness of *B. subtilis* obtained in this study agree with the results reported by other researchers. It has been consistently demonstrated that *B. subtilis* is effective to

tras el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) y el testigo absoluto también fueron estadísticamente iguales, con 0% de incidencia de la enfermedad. Finalmente, en la cuarta evaluación (12 ddi), el testigo inoculado alcanzó una incidencia promedio de 100%, mientras que el tratamiento *B. subtilis* 2×10^7 UFC mL⁻¹ la incidencia se incrementó a 41.3% y en el tratamiento *B. subtilis* 4×10^7 UFC mL⁻¹ la incidencia se incrementó a 38.8%; sin embargo, ambos tratamientos (2×10^7 y 4×10^7 UFC mL⁻¹) fueron estadísticamente iguales. En los tratamientos *B. subtilis* 6×10^7 UFC mL⁻¹ y el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo) presentaron un incremento del 2% en la incidencia de la enfermedad respecto a lo registrado en la tercera evaluación siendo estadísticamente iguales. Por último, las plantas tratadas con metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) se mantuvieron sanas, es decir, con 0% de incidencia de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en la presente investigación sobre la efectividad de *B. subtilis* corresponden a lo reportado por otros investigadores. Se ha demostrado consistentemente que *B. subtilis* es eficiente para el control de *F. oxysporum* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Fusarium* sp. (Illa *et al.*, 2020), *P. capsici* (Khalaf y Raizada, 2018) y *R. solani* (Brewer y Larkin, 2005) en diferentes hospedantes, incluyendo cucurbitáceas. De igual forma, los resultados obtenidos con la aplicación de metil tiofanato, concuerdan con los resultados de investigaciones previas que documentan la efectividad de este fungicida metil benzimidazol carbamato para el control de *F. oxysporum* en varios hospedantes (Nel *et al.*, 2007; Tarekegn *et al.*, 2007). Asimismo, el metil tiofanato reduce efectivamente la infección por *R. solani* en diferentes hospedantes (Hancock, 1993; Kumar *et al.*, 2003; Olaya *et al.*, 1994). El propamocarb clorhidrato es un ingrediente activo ampliamente usado para el control de oomicetes,

control *F. oxysporum* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Fusarium* sp. (Illa *et al.*, 2020), *P. capsici* (Khalaf and Raizada, 2018) and *R. solani* (Brewer and Larkin, 2005) in different hosts, including cucurbitaceae. Similarly, the results obtained using methyl thiophanate are consistent with the results of previous studies that document the effectiveness of methyl benzimidazole carbamate to control *F. oxysporum* in several hosts (Nel *et al.*, 2007; Tarekegn *et al.*, 2007). Methyl thiophanate is also effective to reduce *R. solani* infection in different hosts (Hancock, 1993; Kumar *et al.*, 2003; Olaya *et al.*, 1994). Propamocarb hydrochloride is a widely used active ingredient for the control of oomycetes, including *Phytophthora* spp. in cucurbitaceae (Deadman *et al.*, 2002).

After the 12 days of the experiment, no increase in the percentage of diseased plants in the treatments was observed. None of the evaluated treatments caused phytotoxicity to zucchini squash seedlings. In the re-isolation of the phytopathogenic fungi which were recovered from the inoculated control, the frequency obtained was of 50, 35 and 15% for *P. capsici*, *R. solani* and *F. oxysporum*; these data coincided with the frequency of seedlings collected in the field. This suggests that the dumping off symptoms observed in the combined inoculation were mainly caused by *P. capsici* infection. The first symptoms, caused by the combined inoculation, appeared in a shorter period than that observed when the pathogens were individually inoculated (Fernández-Herrera *et al.*, 2007), thus indicating that when *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* were combined, the inoculation was more aggressive, because the incubation period was of only 72 h. In this study, a higher radical development of plants treated with *B. subtilis* was qualitatively observed. Although none of the treatments based on *B. subtilis* completely protected the zucchini squash seedlings from the combined infection of *F.*

incluyendo *Phytophthora* spp. en cucurbitáceas (Deadman *et al.*, 2002).

Posterior a los 12 días de la evaluación del experimento, no se observó incremento en el porcentaje de plantas enfermas en los tratamientos. Ninguno de los tratamientos evaluados causó fitotoxicidad en las plántulas de calabacita. En el reaislamiento de hongos fitopatógenos recuperados de las plántulas del testigo inoculado se obtuvo una frecuencia de 50, 35 y 15% para *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum*, datos que coincidieron en frecuencia de las plántulas colectadas en campo. Lo anterior sugiere que los síntomas de ahogamiento observados en la inoculación combinada se deben principalmente a la infección por *P. capsici*. Los síntomas iniciales, causados por la inoculación combinada, se presentaron en un periodo más corto que lo observado en la inoculación individual de los patógenos (Fernández-Herrera *et al.*, 2007), lo que indica que la inoculación conjunta de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* fue más agresiva, presentando un periodo de incubación de solo 72 h. En el presente estudio, se observó de manera cualitativa un mayor desarrollo radical de las plantas tratadas con *B. subtilis*. Aun cuando ninguno de los tratamientos a base de *B. subtilis* protegieron completamente a las plántulas de calabacita de la infección conjunta de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*, se observó la siguiente tendencia: a mayor concentración de la bacteria, se registró una menor incidencia de la enfermedad. El tratamiento con *B. subtilis* a 6×10^7 UFC mL⁻¹, fue estadísticamente igual que el tratamiento químico curativo, lo que demuestra la factibilidad de su uso en el manejo biológico de la enfermedad. En el caso del tratamiento químico preventivo fue estadísticamente igual que el testigo absoluto, corroborándose así la efectividad del control químico. No obstante, dentro de la tendencia actual en la reducción del uso de moléculas sintéticas en la producción agrícola, el uso preventivo de productos biológicos es

oxysporum, *P. capsici* and *R. solani*, the following tendency was observed: the higher the concentration of bacterium, the lower the disease incidence. The treatment based on *B. subtilis* at 6×10^7 UFC mL⁻¹ was statistically equal to the curative chemical treatment, which demonstrates its potential for the biological management of the disease. The preventive chemical treatment was statistically equal to the absolute control, thereby demonstrating the effectiveness of the chemical control. However, as part of the current trend in reducing the use of synthetic molecules in agricultural production, the preventive use of biological products is the ecologically viable response to manage the disease. The use of higher concentrations of *B. subtilis* is suggested in further studies.

The products evaluated helped consistently to reduce the incidence of zucchini squash seedlings death. The biological product based on *B. subtilis* at a concentration of 6×10^7 UFC mL⁻¹ protected more than 80% of the zucchini squash seedlings which were inoculated with *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani*; its effectiveness was statistically equal to that of the curative treatment based on methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride. The preventive treatment based on methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride protected 100% of the seedlings from the inoculation of the three pathogens.

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

la respuesta ecológicamente viable para el manejo de la enfermedad. En estudios posteriores se sugiere evaluar concentraciones más altas de *B. subtilis*.

Los productos evaluados contribuyeron consistentemente a disminuir la incidencia de la muerte de plántulas de calabacita. El producto biológico



a base de *B. subtilis* a una concentración de  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> protegió más del 80% de las plántulas de calabacita inoculadas con *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*, teniendo una efectividad estadísticamente igual al tratamiento curativo de metil tiofanato + propamocarb clorhidrato. Mientras que el tratamiento preventivo de metil tiofanato + propamocarb clorhidrato protegió al 100% de las plántulas de la inoculación de los tres patógenos.

## LITERATURA CITADA

- Ayala-Armenta QA, Tovar-Pedraza JM, Apodaca-Sánchez MA, Correia KC, Saucedo-Acosta CP, Camacho-Tapia M and Beltrán-Peña H. 2020. Phylogeny and pathogenicity of soilborne fungi associated with wilt disease complex of tomatillo (*Physalis ixocarpa*) in northern Sinaloa, Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 157: 733-749. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02030-9>
- Brewer MT and Larkin RP. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection* 24(11): 939-950. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.012>
- Cavaglieri L, Orlando J, Rodriguez MI, Chulze S and Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156(5-6): 748-754. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- Chehri K, Abbasi S, Reddy KRN and Salleh B. 2010. Occurrence and pathogenicity of various pathogenic fungi on cucurbits from Kermanshah province, Iran. *African Journal of Microbiology Research* 4(12): 1215-1223. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000532>
- Deadman ML, Al-Saadi AM, Al-Mahmuli I, Al-Maqbali YM, Al-Subhi R, Al-Kiyoomi K, Al-Hasani H and Thacker JRM. 2002. Management of *Pythium aphanidermatum* in greenhouse cucumber production in the Sultanate of Oman. Pp. 171-176. In: The BCPC Conference: Pest and diseases. Vol. 2. Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK. 1042 p
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathology Society, MN, USA. 562p.
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L and Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology* 39: 869-878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- Fernández-Herrera E, Acosta-Ramos M, Ponce-González F y Manuel-Pinto V. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 35-42. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a5.pdf>
- Hamdache A, Lamarti A, Aleu J and Collado IG. 2011. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products* 74(4): 893-899. <https://doi.org/10.1021/np100853e>
- Hancock JG. 1993. Fungal rootlet colonization and forage yields of alfalfa in fungicide-treated field plots. *Plant Disease* 77: 601-608. <https://doi.org/10.1094/pd-77-0601>
- Hausbeck MK and Lamour KH. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88(12): 1292-1303. <https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.12.1292>
- Illa C, Pérez AA, Torassa M and Pérez MA. 2020. Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 119-131. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-6>
- Khalaf EM and Raizada MN. 2018. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Frontiers in Microbiology* 9: 42. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>
- Khedher SB, Kilani-Feki O, Dammak M, Jabnoun-Kharreddine H, Daami-Remadi M and Tounsi S. 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus Biologies* 338(12): 784-792. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2015.09.005>
- Koike ST, Gladders P and Paulus AO. 2007. Vegetable diseases. A colour handbook. Manson Publishing. London, UK, 448p. <https://www.crcpress.com/Vegetable-Diseases-A-Colour-Handbook/T-Koike-Gladders-Paulus/p/book/9781840760750>
- Kumar V, Haseeb A and Shukla PK. 2003. Effect of carbofuran, Topsin-M and neem cake on *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani* infesting *Hyoscyamus niger*. *Current Nematology* 14: 1-4. <http://biovedjournal.org/Current%20Nematology%20journal.html>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The Fusarium laboratory manual. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA. 388p. <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- Márquez-Licona G, Leyva-Mir SG, De León C, Hernández-Vargas M, Téliz-Ortiz D, Kolařík M and Castillo-González F. 2018. Artificial inoculation of maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Maydica* 63(1): 1-8. <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/1593>
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristobal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Borges-Gómez LC and Pacheco-Aguilar JR. 2016. *Bacillus* spp. in the control of wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. *Mexican Journal of Phytopathology* 34(3): 208-222. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-1>
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne N and Viljoen A. 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection* 26(4): 697-705. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.008>
- Olaya G, Abawi GS and Barnard J. 1994. Response of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* to five fungicides

- and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Plant Disease* 78: 1033–1037. <https://doi.org/10.1094/pd-78-1033>
- Ongena M and Jacques P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16(3): 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Scheuerell SJ, Sullivan DM and Mahaffee WF. 2005. Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources. *Phytopathology* 95(3): 306–315. <https://doi.org/10.1094/phyto-95-0306>
- Sharma N and Sharma S. 2008. Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. *Microbiological Research* 163: 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.011>
- Sneh B, Burpee L and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopathology Society, MN, USA. 133p.
- Tarekegn G, Sakhujia PK, Swart WJ and Tamado T. 2007. Integrated management of groundnut root rot using seed quality and fungicide seed treatment. *International Journal of Pest Management* 53(1): 53–57. <https://doi.org/10.1080/09670870601058940>
- Vakalounakis DJ and Chalkias J. 2004. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in soil. *Crop Protection* 23(9): 871–873. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.01.011>
- Villareal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI and De los Santos-Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology* 36(1): 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Wise C, Novitsky L, Tsopmo A and Avis TJ. 2012. Production and antimicrobial activity of 3-hydroxypropionaldehyde from *Bacillus subtilis* strain CU12. *Journal of Chemical Ecology*. 38: 1521–1527. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0219-2>
- Zitter T, Hopkins D y Thomas C. 2004. Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. American Phytopathological Society. Mundi-Prensa. Madrid, España. 88p.

# ***In vitro* control of *Fusarium* sp. associated with onion crop through *Trichoderma harzianum***

## **Control *in vitro* de *Fusarium* sp. asociado al cultivo de cebolla mediante *Trichoderma harzianum***

**Saira J. Martínez-Salgado, Petra Andrade-Hoyos, Omar Romero-Arenas\***, Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Pedro Zacachimalpa, CP. 72960, Puebla, México; **Nemesio Villa-Ruano, Gerardo Landeta-Cortés**, CONACyT, Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología-DITCo; **José Antonio Rivera-Tapia**, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla CP. 72570, México. \*Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Recibido: 25 de Enero, 2021.

Aceptado: 02 de Marzo, 2021.

Martínez-Salgado SJ, Andrade-Hoyos P, Romero-Arenas O, Villa-Ruano N, Landeta-Cortés G and Rivera-Tapia JA. 2021. *In vitro* control of *Fusarium* sp. associated with onion crop through *Trichoderma harzianum*. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 314-328

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-4>

Primera publicación DOI: 22 de Marzo, 2021.

First DOI publication: March 22, 2021.

**Resumen.** La cebolla es la segunda hortaliza de mayor producción en el mundo. En México constituye un cultivo de gran importancia económica en diversos estados. El objetivo de la presente investigación fue identificar y caracterizar morfológicamente la cepa CFbC asociada a la podredumbre basal del cultivo de cebolla, así como determinar

**Abstract.** Onion is the second largest production vegetable in the world. In Mexico it is a crop of great economic importance in various states. The objective of this research was to identify and morphologically characterize the CFbC strain associated with basal rot of onion crops, as well as to determine the *in vitro* antagonistic capacity of *Trichoderma harzianum* T-H4 on the isolate. Vegetable tissue samples showing rot at the stem and bulb level of the onion crop were collected and monosporic cultures were generated for their characterization and identification by the ITS1 and ITS4 regions. A 533 bp sequence of CFbC strain was obtained, which presented 100% identity with *Fusarium* sp., Associated with basal rot. The *T. harzianum* strain presented a percentage of radial growth inhibition (PICR) of 76.24% antagonistic level *in vitro* and a class II on the Bell scale. It is suggested to carry out biological control

la capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* T-H4 sobre *Fusarium* sp. Se colectaron muestras de tejido vegetal que presentaban pudrición a nivel de tallo y bulbo del cultivo de cebolla y se generaron cultivos monospóricos para su caracterización e identificación por las regiones ITS1 e ITS4. Se obtuvo una secuencia de 533 pb de cepa CFbC, que presentó 100% de identidad con *Fusarium* sp., asociada a la podredumbre basal. La cepa *T. harzianum* presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de 76.24% de nivel antagónico *in vitro* y una clase II en la escala de Bell. Se sugiere realizar evaluaciones de control biológico con la cepa T-H4 en invernadero y a campo abierto, así como su identificación a nivel especie con técnicas moleculares complementarias.

**Palabras clave:** Antagonismo, identificación molecular, crecimiento micelial, PICR.

La cebolla (*Allium cepa*) es considerada uno de los ingredientes indispensables en la dieta y cultivada alrededor del mundo (Joaheer *et al.*, 2019). En México es el tercer cultivo de mayor importancia en las hortalizas, con una producción de 85,104 t para el año 2018 en un área sembrada aproximada de 7,329 ha, dejando una derrama económica de 26,029,376 millones de dólares (FAO, 2020). Baja California es el principal estado productor de cebolla con superficie sembrada de 3,443 ha, mientras que Puebla ocupa el quinto lugar con 2,480 ha con un rendimiento de 21,371 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2020).

Las enfermedades causadas por hongos que se presentan con mayor frecuencia en esta hortaliza, y pueden afectar follaje, raíz y fruto durante las etapas de precosecha y postcosecha (Ji *et al.*, 2018). Algunas de las enfermedades con mayor incidencia en el género *Allium* son causadas por *Rhizoctonia solani*, *Brotrytis allii*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum*

evaluations with the T-H4 strain in the greenhouse and in the open field, as well as its identification at the species level.

**Keywords:** Antagonism, molecular identification, mycelial growth, PICR.

Onion (*Allium cepa*) is considered one of the basic ingredients in human diets and as a crop around the world (Joaheer *et al.*, 2019). In Mexico, it is the third most important vegetable, with a production of 85,104 t for the year 2018, planted in approximately 7,329 ha, leaving a revenue of de 26,029,376 dollars (FAO, 2020). Baja California is the state that produces the most onion, with a surface of 3,443 ha, and the state of Puebla is fifth, with 2,480 ha and a yield of 21,371 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2020).

The most frequent diseases caused by fungi in this vegetable can affect foliage, roots and fruits during the stages of harvest and postharvest (Ji *et al.*, 2018). Some of the diseases with the highest incidence on the *Allium* species are caused by *Rhizoctonia solani*, *Brotrytis allii*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum circinans* and *Fusarium* spp. (Montes-Belmont *et al.*, 2003), the latter being the main devastator of this crop in recent years (Abdalla *et al.*, 2019). Basal rot caused by the genus *Fusarium* spp. is widely distributed around the globe and has become a limitation in onion and garlic producing areas (Kiehr y Delhey, 2015). The main species within the genus *Fusarium* that harms the onion crop around the world are *F. proliferatum*, *F. solani* and *F. oxysporum*, reducing its yield by up to 50% (Haapalainen *et al.*, 2016), and it produces symptoms in the onion plant that include wilting, rotting of the roots and the basal lamina of the bulb (Sanogo and Zhang, 2015). In Mexico, the genus *Fusarium* is responsible for diverse diseases in

*circinans* y *Fusarium* spp. (Montes-Belmont *et al.*, 2003), este último es considerado como el principal devastador de este cultivo durante los últimos años (Abdalla *et al.*, 2019). La pudrición basal ocasionada por el género *Fusarium* spp., se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, convirtiéndose en una limitante en zonas productoras de cebolla y ajo (Kiehr y Delhey, 2015). Las principales especies del género *Fusarium* que daña al cultivo de cebolla alrededor del mundo son *F. proliferatum*, *F. solani* y *F. oxysporum* reduciendo hasta un 50% su rendimiento (Haapalainen *et al.*, 2016), donde los principales síntomas de las plantas de cebolla son: marchitamiento, pudrición de raíces y de la placa basal del bulbo (Sanogo y Zhang, 2015). En México, el género *Fusarium* es responsable de diversas enfermedades en cultivos de cebolla (Montes-Belmont *et al.*, 2003). Por eso su importancia en la presente investigación.

Los productos de síntesis química se han empleado por décadas para el control de estas enfermedades (Gan y Wickings, 2017). Sin embargo, el uso de éstos está relacionado con la generación de resistencia, daños al ambiente y la salud humana (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Por lo tanto, el control biológico se considera una de las prácticas eficientes y ecológicamente viables para el desarrollo de una agricultura sostenible (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

El género *Trichoderma* contiene especies antagonistas capaces de controlar un amplio número de hongos que afectan a las plantas de interés agrícola (Romero-Arenas *et al.*, 2017). El éxito y su uso en la agricultura se debe a sus mecanismos de acción como la competencia por espacio, micoparasitismo, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018), y la producción de compuestos volátiles (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). En consecuencia, los objetivos de este trabajo fueron caracterizar morfológicamente aislados fúngicos del género *Fusarium* asociados a bulbos de cebolla en la comunidad rural La Soledad,

onion plantations (Montes-Belmont *et al.*, 2003). Hence its importance in this investigation.

Chemically synthesized products have been used for decades in the control of these diseases (Gan and Wickings, 2017). However, their use is related to the generation of resistance, environmental damage and the deterioration of human health (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Therefore, biological control is considered an efficient and environmentally feasible practice for the development of sustainable agriculture (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

The genus *Trichoderma* contains antagonistic species capable of controlling a wide number of fungi that affect plants of agricultural interest (Romero-Arenas *et al.*, 2017). Its success and use in agriculture are due to its action mechanisms such as the competition for space, mycoparasitism, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018), and the production of volatile compounds (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Consequently, the aims of this investigation were to morphologically characterize fungal isolations of the genus *Fusarium* relates to onion bulbs in the rural town of La Soledad, Chietla, Puebla-Mexico and to determine the *in vitro* antagonistic ability of *T. harzianum* T-H4 on fungal isolations of the onion crop.

**Isolation area.** Plant tissues with rotting of the stem (basal lamina) or bulb and scarce radicle development were collected from a 3,144.3 m<sup>2</sup> “Crystal white” onion field with a background of high fungal incidence during the summer-autumn 2019 production season (18° 27' 39.3258" N and -98° 37' 11.2614" W). The field belongs to the town of La Soledad, in the municipal area of Chietla in the state of Puebla, with a warm desert weather (Bwh) and a mean rainfall of 700 mm (García, 2004). Sampling was aimed at individuals with symptoms related to the genus *Fusarium*; all samples were kept in an ice box until they were transferred to the laboratory.

Chietla, Puebla-México y determinar la capacidad antagonista *in vitro* de *T. harzianum* T-H4 sobre aislados fúngicos del cultivo de cebolla.

**Zona del aislamiento.** Se colectaron muestras de tejido vegetal con pudrición a nivel de tallo (disco basal) o bulbo, y poco desarrollo radicular en una parcela de 3 144.3 m<sup>2</sup> de cultivo de cebolla variedad “Crystal white” con antecedentes de alta incidencia fúngica durante la producción verano-otoño 2019 (18° 27' 39.3258" y -98° 37' 11.2614"). La parcela agrícola corresponde a la comunidad La Soledad, perteneciente al municipio de Chietla del estado de Puebla, con un clima desértico cálido (Bwh) y precipitación media de 700 mm (García, 2004). El muestreo fue dirigido hacia individuos con síntomas asociados al género *Fusarium*; todas las muestras se mantuvieron en bolsas de plástico dentro de una hielera hasta su traslado al laboratorio.

**Aislamiento de *Fusarium* sp. de tejidos vegetales.** Se seleccionaron 30 bulbos para ser desinfectados con agua corriente e hipoclorito de sodio al 10%. Se colocaron porciones de bulbos en cámaras húmedas; para esto se utilizaron cajas de polietileno y papel filtro estéril húmedo, finalmente las cajas de polietileno se incubaron a 28 °C, por 10 días. Una vez terminado el tiempo de incubación, el tejido muerto de los bulbos se cortó en secciones de 0.5 cm<sup>2</sup>, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% y se lavaron tres veces con agua destilada. Se secaron con papel estéril y finalmente se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a una temperatura de 28 °C con luz ambiental, por tres días. Las colonias desarrolladas fueron aisladas y purificadas mediante cultivos monospóricos, siguiendo las indicaciones de Morales *et al.* (2020).

**Isolation of *Fusarium* sp. from plant tissues.**

Thirty bulbs were selected to be disinfested with tap water and sodium hypochlorite at 10%. Pieces of bulb were placed in wet chambers, using polyethylene boxes and moist filter paper; the polyethylene boxes were incubated at 28 °C for 10 days. After the incubation time, the dead bulb tissue was cut into 0.5 cm<sup>2</sup> sections, disinfested with sodium hypochlorite at 1.5% and washed three times with distilled water. They were dried using sterilized paper and finally planted in Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA) at a temperature of 28 °C with ambient light for three days. The cultures developed were isolated and purified using monospore cultures, following indications by Morales *et al.* (2020).

**Morphological characterization.** The fungal cultures obtained were identified with an analysis of morphological characteristics related to the genus *Fusarium* with taxonomic identification keys by Barnett and Hunter (2006), in a microcultivation system under an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 1000x (Samson *et al.*, 2014). To evaluate the mycelial development, pieces of the promissory isolations were inoculated in Petri dishes with PDA, incubated in the dark at 28 °C for 10 days and the mycelial diameter was measured every 12 h to estimate the growth speed (cm), which was measured with the linear growth function  $y=mx + b$  (where ‘y’ is the distance, ‘x’ is time and ‘b’ is the constant factor) and expressed in centimeters per day (cm d<sup>-1</sup>) (Zeravakis *et al.*, 2001). The diameter was measured using a digital caliper (CD-6 Mitutoyo), always in the same direction—in triplicate—which was established at random for each repetition. Only the average was used to calculate the speed of mycelial growth per day.

**Caracterización morfológica.** La identificación de las colonias fúngicas obtenidas se realizó mediante el análisis de características morfológicas asociadas al género *Fusarium* con claves taxonómicas de identificación de Barnett y Hunter (2006), en un sistema de micro cultivo en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones (Samson *et al.*, 2014). Para la evaluación del desarrollo micelial, se inocularon fragmentos de los aislados promisorios en cajas Petri con PDA, se incubaron bajo oscuridad a 28 °C por 10 días y se midió el diámetro micelial cada 12 h para estimar la velocidad de crecimiento (cm), la cual se calculó con la función de crecimiento lineal  $y=mx + b$  (donde 'y' es la distancia, 'x' es el tiempo y 'b' el factor constante) y se expresó en centímetros por día ( $\text{cm d}^{-1}$ ) (Zeravakis *et al.*, 2001). El diámetro se midió con un vernier digital (CD-6 Mitutoyo), siempre en la misma dirección -por triplicado-, la cual fue establecida al azar para cada repetición, se usó solo el promedio para calcular la velocidad de crecimiento micelial por día.

**Identificación molecular.** Se extrajo ADN de conidios, conidióforos y micelio de los aislados obtenidos con características morfológicas asociadas a *Fusarium*, mediante el método CTAB 2% (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018). El ADN se re-suspendió en 100 mL de agua HPLC estéril y se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop 2 000 C, Thermo Scientific). Posteriormente, se diluyó a 20 ng  $\text{mL}^{-1}$  y se almacenó a -20 °C. Para la amplificación se utilizó los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), y 15  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción que contenían 0.18  $\mu\text{L}$  de cada cebador, 0.18  $\mu\text{L}$  de dNTP, 0.9  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa GoTaqVR (Promega), 3  $\mu\text{L}$  de suspensión de ADN y 10.56  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La amplificación se realizó en un termociclador de ADN Peltier (PTC-200, Bio-Rad), 95 °C por 1 min; 35 ciclos a 95 °C por 30 s; 55 °C por 1 min;

**Molecular identification.** DNA was extracted from conidia, conidiophores and mycelia from the isolations obtained with morphological characteristics related to *Fusarium*, using the CTAB 2% method (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018). The DNA was resuspended in 100 mL of sterilized HPLC water and quantified using spectrophotometry (Nanodrop 2 000 C, Thermo Scientific). Next, it was diluted to 20 ng  $\text{mL}^{-1}$  and stored at -20 °C. For the amplification, primers ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990) were used, along with 15  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture containing 0.18  $\mu\text{L}$  of each primer, 0.18  $\mu\text{L}$  of dNTP, 0.9  $\mu\text{L}$  of GoTaqVR (Promega) polymerase DNA, 3  $\mu\text{L}$  of DNA suspension and 10.56  $\mu\text{L}$  of distilled water. Amplification was carried out in a Peltier (PTC-200, Bio-Rad) DNA thermocycler at 95 °C for 1 min; 35 cycles at 95 °C for 30 s; 55 °C for 1 min; an extension of 72 °C for 45 s; and finally, 72 °C for 5 min (Salazar-González *et al.*, 2016). The amplified PCR products were verified by electrophoresis in agarose gel at 1.5% (Seakem) and were purified with ExoSAP-IT (Affymetrix). Both chains were sequenced in the Colegio de Posgraduados with BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) in a 3 130  $\times\text{L}$  genetic analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the software Bioedit 7.0.4.1, following instructions by the manufacturer. The sequence obtained was deposited in the Gen Bank's National Center for Biological Information (NCBI) database and compared with five accessions (Table 1) available in the NCBI database to confirm its identity (Nei and Kumar, 2000).

**In vitro pathogenicity tests.** Koch's postulates were implemented to confirm the pathogenicity of *Fusarium* sp. Certified onion seeds of the variety Crystal white with a percentage of germination of 90% were used after disinfecting. Six seeds were placed in each Petri dish and after germinating,

extensión de 72 °C por 45 s; finalmente 72 °C por 5 min (Salazar-González *et al.*, 2016). Los productos de PCR amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Seakem) y se purificaron con ExoSAP-IT (Affymetrix); ambas cadenas se secuenciaron en el Colegio de posgraduados con BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) en un secuenciador analizador genético 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el software Bioedit 7.0.4.1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) del Gen Bank, y se comparó con cinco accesos (Cuadro 1) disponibles en la base de datos del NCBI para corroborar su identidad (Nei y Kumar, 2000).

**Pruebas de patogenicidad *in vitro*.** Se implementaron los postulados de Koch para confirmar la patogenicidad de *Fusarium* sp. Se utilizaron semillas certificadas de cebolla variedad Crystal white con un porcentaje de germinación del 90%, las cuales fueron desinfectadas previo a su uso. Se colocaron seis semillas por caja Petri y una vez germinadas se colocaron discos de 5 mm de diámetro con micelio de *Fusarium* sp., en el centro de la caja Petri por triplicado con dos repeticiones; como grupo control se utilizó un disco de 5 mm de diámetro de agar-agua estéril. Las semillas se incubaron dentro de

discs, 5 mm in diameter with *Fusarium* sp. mycelia were placed in the center of the Petri dish, in triplicate with two repetitions; a disc, 5 mm in diameter with sterile agar-water was used as a control. The seeds were incubated inside a controlled-temperature ( $22 \pm 2$  °C) environmental chamber in complete darkness until 90% of the control group germinated. After this moment, a radicle length of over 5 mm was used as a germination criterion; the growth or elongation of the radicles were recorded in both groups (OECD, 1984; USEPA, 1996). The data recorded underwent the Shapiro and Wilk test of normality ( $p < 0.05$ ) and were compared based on Student's *t* test for paired samples ( $p < 0.05$ ) (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). Finally, small sections (approx.  $1 \times 1$  cm) were taken from radicles with disease symptoms, sterilized on the surface with sodium hypochlorite at 1% for 10-30 s and rinsed three times with sterile distilled water for reisolation; the segments were then placed in a PDA medium and incubated in the dark at 28 °C for 10 days. Next, the isolation was observed under the optical microscope to confirm that it was strain CFbC using taxonomic identification keys (Barnett and Hunter, 2006).

**Evaluation of the antagonism of *T. harzianum* with *Fusarium* sp. in dual culture.** The evaluation of the antagonism was carried out using strain

**Cuadro 1. Especies del complejo de *F. incarnatum-equiseti* y secuencias del GenBank para corroborar identidad de la cepa CFbC.**  
**Table 1. Species of the *F. incarnatum-equiseti* complex and GenBank sequences to confirm the identity of strain CFbC.**

| No. Acceso | Complejo de especie           | Lugar     | Hospedante                     | Pb  | Identidad |
|------------|-------------------------------|-----------|--------------------------------|-----|-----------|
| KP026922   | <i>F. incarnatum-equiseti</i> | USA       | <i>Citrullus lanatus</i>       | 550 | 100%      |
| HM999942   | <i>F. incarnatum-equiseti</i> | Ecuador   | <i>Piper reticulatum</i>       | 519 | 100%      |
| HQ625642   | <i>F. incarnatum-equiseti</i> | Nicaragua | <i>Phaseolus vulgaris</i>      | 399 | 100%      |
| KX375792   | <i>F. incarnatum-equiseti</i> | Colombia  | <i>Musa paradisiaca</i>        | 440 | 100%      |
| KY461086   | <i>F. incarnatum-equiseti</i> | Brasil    | <i>Schinus terebinthifolia</i> | 363 | 100%      |



una cámara ambiental con temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) y en total oscuridad, hasta que el 90% de las semillas del grupo control hubieran germinado. Después de ese periodo, se utilizó como criterio de germinación una longitud de radícula mayor de 5 mm, se registra el crecimiento o alargamiento de la radícula de ambos grupos (OECD, 1984; USEPA, 1996). Los datos registrados se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk ( $p < 0.05$ ), así mismo, se compararon en base a la prueba *t* de student para muestras apareadas ( $p < 0.05$ ) (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). Finalmente, se tomaron secciones pequeñas (aprox.  $1 \times 1$  cm) de radículas con síntomas de enfermedad, se esterilizaron en la superficie con hipoclorito de sodio al 1% durante 10-30 s y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para el re-aislamiento, los segmentos fueron colocados en medio PDA, se incubaron bajo oscuridad a 28 °C por 10 días. Posteriormente el aislado se observó en el microscopio óptico para confirmar que se tratara de la cepa CFbC a través de claves taxonómicas de identificación (Barnett y Hunter, 2006).

**Evaluación de antagonismo de *T. harzianum* ante *Fusarium* sp. en cultivos duales.** La evaluación del antagonismo se realizó con la cepa T-H4 de *T. harzianum*, aislada de la raíz de *Persea americana*, cuya secuencia se incluyó en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso MK779064.1, misma que está en el laboratorio de Eco-Campus Valsequillo, del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). Se utilizó la técnica de cultivo dual de acuerdo con Andrade-Hoyos *et al.* (2019) -por triplicado- para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial con la fórmula  $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$  para cada ensayo evaluado por un lapso de 10 días. Los datos registrados se

T-H4 of *T. harzianum*, isolated from the root of *Persea americana*, the sequence of which was included in the data base of the National Center for Biological Information (NCBI) with accession number MK779064.1, which is in the laboratory of the Eco-Campus Valsequillo, of the Institute of Science, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (Andrade-Hoyos *et al.*, 2020). The dual culture technique was used, following Andrade-Hoyos *et al.* (2019) -in triplicate- to determine the percentage of radial growth inhibition with the formula  $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$  for each trial evaluated for a 10-day period. The data recorded underwent the Shapiro Wilk test ( $p < 0.05$ ) and compared based on Student's *t* test for paired samples ( $p < 0.05$ ) in the IBM SPSS Statistics statistical package, version 25 (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). The experiment was performed twice for its validation. In order to complement the evidence of antagonism, each trial was compared and classified with the scale established by Bell *et al.* (1982): I) the growth of *T. harzianum* covered the entire surface of the medium and reduced the *Fusarium* sp. culture, II) the growth of *T. harzianum* covered at least two-thirds of the medium, III) *T. harzianum* and *Fusarium* sp. grew over 1/2 and 1/2 of the medium's surface, without superposing each other, IV) *Fusarium* sp. grew over at least 2/3 of the medium and resisted the invasion of *T. harzianum* and V) the growth of *Fusarium* sp. covered the entire surface of the medium.

**Identification.** Using the proposed isolation strategy, only one culture related to the genus *Fusarium* was obtained. Strain CFbC displayed a radial growth with a speed of growth of  $0.5294 \pm 0.0833$  cm d<sup>-1</sup>, a range which agrees with the study by Groenewald *et al.* (2006). The culture of strain CFbC was abundant aerial mycelia, initially white, but after maturing they turned slightly cinnamon-

sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk ( $p < 0.05$ ), así mismo, se compararon en base a la prueba  $t$  de student para muestras apareadas ( $p < 0.05$ ) en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25 (Iturbide-Zuñiga *et al.*, 2017). El experimento se repitió dos veces para su validación. Para complementar las evidencias del antagonismo, se comparó y clasificó cada ensayo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982): I) crecimiento de *T. harzianum* cubrió toda la superficie del medio y redujo la colonia de *Fusarium* sp., II) crecimiento de *T. harzianum* cubrió al menos 2/3 partes del medio, III) *T. harzianum* y *Fusarium* sp., crecieron 1/2 y 1/2 de la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro, IV) *Fusarium* sp., creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de *T. harzianum* y V) crecimiento de *Fusarium* sp., cubrió toda la superficie del medio.

**Identificación.** Utilizando la estrategia propuesta de aislamiento, sólo una colonia asociada al género *Fusarium* fue obtenida. La cepa CFbC se caracterizó por presentar un crecimiento radial con una velocidad de crecimiento de  $0.5294 \pm 0.0833$  cm d<sup>-1</sup>, rango que concuerda con el estudio de Groenewald *et al.* (2006). El aspecto de la colonia de la cepa CFbC fue abundante micelio aéreo, al principio de color blanco, pero al madurar se tornan ligeramente color café canela, al reverso de la placa, se muestra una coloración ligeramente naranja (Figura 1a y b). La cepa CFbC presentó hifas septadas, hialinas, macroconidios tabicados con cinco septos, falcados, con una curvatura distintiva de longitud de 60-120  $\mu$ m aprox. (Figura 1c), con pared gruesa que en su parte ventral se arquea ligeramente y en la parte dorsal se arquea abruptamente, con una célula basal en forma de pie y la parte apical filamentosa. Las características morfológicas mencionadas anteriormente, coincidieron con las descritas por Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium* sp.

brown, and on the reverse of the dish, a slightly orange color can be noticed (Figure 1a and b). Strain CFbC presented septated hyphae, hyalines, septated macroconidia with five septa, with a distinct curvature, a length of approximately 60-120  $\mu$ m (Figure 1c), with a thick wall, slightly arched in the ventral part, and abruptly arched in the dorsal part, with a foot-shaped basal cell and a filamentous apical section. The morphological characteristics mentioned above coincided with those described by Barnett and Hunter (2006), and Leslie and Summerell (2006) for *Fusarium* sp.

The amplification of the ribosomal ITS region gave a product of 533 pb of strain CFbC, which displayed an identity of 100% with the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (Table 1) according to the Gen Bank data base. This sequence was included in the NCBI data base with accession number MN612793.1.

**Pathogenicity tests.** Eight days after the *in vitro* inoculation with strain CFbC, all plants began showing symptoms, with a percentage of germination of 95%. The pathogenicity test results are shown in Figure 2, where a radicle growth below 5 mm (Figure 2a) is presented, along with apical strangulation, necrosis in the radicle (Figure 2b), and colonization in seedlings at the seed germination level in dishes with agar-water (Figure 2c), results which are positive for the inoculation of *Fusarium* sp. In seedlings used as controls, no symptoms were observed (Figure 2d), which proves Koch's postulates.

In the pathogenicity test, radicle growth decreased by 42.02%, displaying significant differences. Koch's postulates were confirmed with the re-isolation of *Fusarium* sp. from rhizomes of seedlings germinated 10 days after inoculation. This pathogen has been reported by Dauda *et al.* (2018), who first reported the regressive death of onion plants caused by *Fusarium equiseti* in Nigeria.

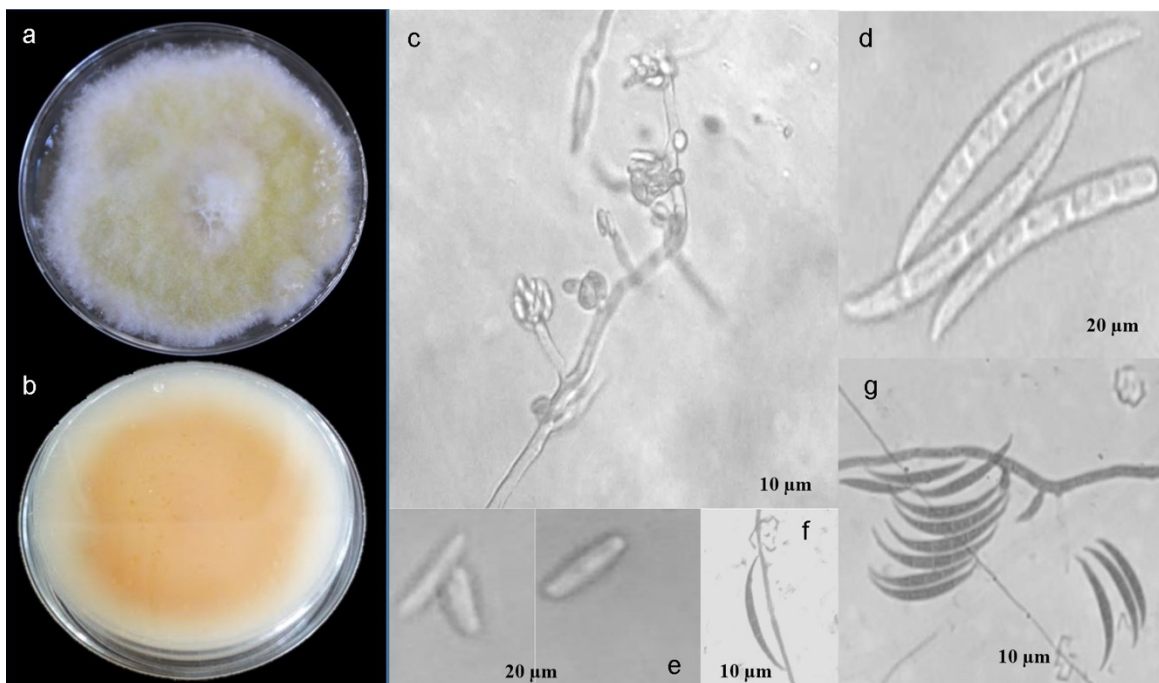


Figura 1. a) Colonia de *Fusarium* sp. en medio PDA, b) Reverso de colonia en PDA, coloración naranja, c) Monofialides cortas y microconidios agrupados en falsas cabezas, d) Macroconidios tabicados con cinco septos, e) Microconidias, f y g) Macroconidias con curvatura distintiva, 40 X.

Figure 1. a) Culture of *Fusarium* sp. in a PDA medium, b) Reverse of culture in PDA, orange coloring, c) Short monophyllids and microconidia grouped into false heads, d) Septated macroconidia with five septa, e) Microconidia, f and g) Macroconidia with distinctive curvatures, 40 X.

Con la amplificación de la región ITS ribosomal se obtuvo un producto de 533 pb de la cepa CFbC, que presentó 100% de identidad con el complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (Cuadro 1) de acuerdo con la base de datos del Gen Bank, esta secuencia se incluyó en la base de datos NCBI con el número de acceso MN612793.1.

**Pruebas de patogenicidad.** Ocho días después de la inoculación *in vitro* con la cepa CFbC todas las plantas comenzaron a mostrar síntomas, presentando un porcentaje de germinación del 95%. Los resultados de las pruebas de patogenicidad se presentan en la Figura 2, donde se observa un crecimiento radicular menor a 5 mm (Figura 2a), ahorcamiento

**Evaluation of the antagonism of *T. harzianum* on *Fusarium* sp., in a dual culture.** Areas of interaction were observed between *T. harzianum* (T-H4) and *Fusarium* sp. (CFbC), in the form of competition for space and nutrients. The reduction in the growth rate in dual cultures is an indicator of the antagonistic capacity of *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). In this study, the growth of *Fusarium* sp. in confrontation of strain T-H4 was clearly inhibited as of five day (Figure 3a). When evaluating the PICR, significant differences ( $p \leq 0,0001$ ) were found in Student's *t* test, with a value of  $t=92.57$ . The PICR was 76.24% (Figure 4b), a value which falls into class II (Figure 4a) according to the scale established



Figura 2. Germinación de semillas inoculadas con *Fusarium* sp. a) Crecimiento raíz mínimo y necrosis, b) Ahorcamiento y necrosis, c) Colonización en parte apical, d) Testigo sin síntomas.

Figure 2. Germination of seeds inoculated with *Fusarium* sp. a) Minimal root growth and necrosis, b) Strangulation and necrosis, c) Colonization in the apex, d) Control without symptoms.

apical, necrosis en la radícula (Figura 2b), y colonización en las plántulas a nivel de germinación de semilla en placas con agar agua (Figura 2c), resultados positivos para la inoculación de *Fusarium* sp. En las plántulas empleadas como testigos no se observaron síntomas (Figura 2d), comprobando con ello los postulados de Koch.

En la prueba de patogenicidad, se observó una reducción del 42.02% en el crecimiento radicular, mostrando diferencias significativas. Los postulados de Koch se confirmaron mediante el re-aislamiento de *Fusarium* sp. de rizomas de plántulas germinadas a los 10 días pos-inoculación. Este patógeno ha sido reportado por Dauda *et al.* (2018) quienes realizaron un primer reporte sobre la enfermedad de muerte regresiva de la cebolla causada por *F. equiseti* en Nigeria.

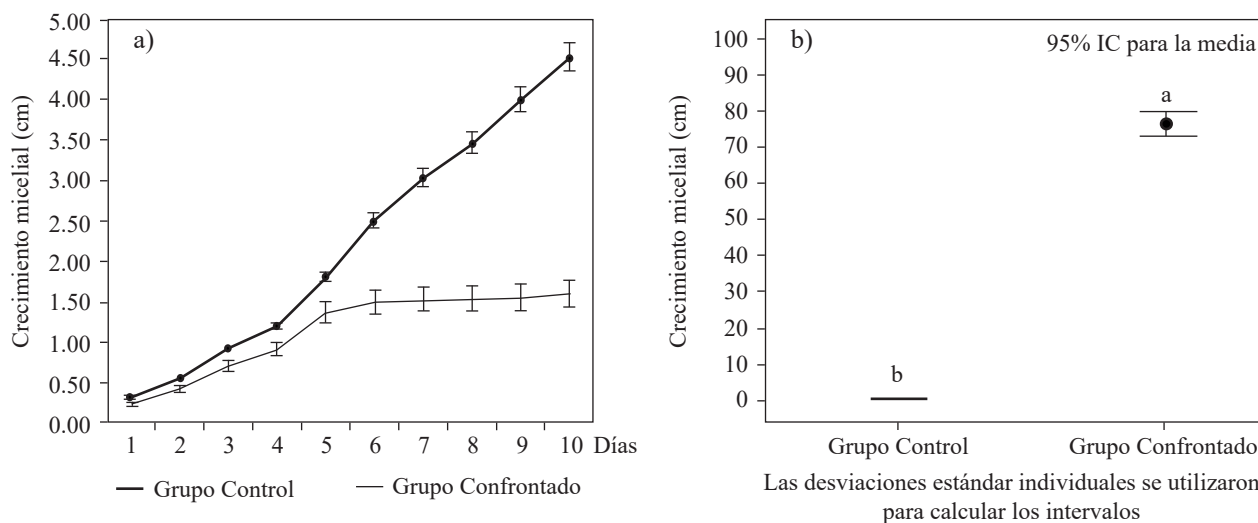
**Evaluación del antagonismo de *T. harzianum* sobre *Fusarium* sp., en cultivo dual.** Se presentaron zonas de interacción entre *T. harzianum* (T-H4) y *Fusarium* sp. (CFbC), donde se observó competencia

by Bell *et al.* (1982). Michel-Aceves *et al.* (2005) report an inhibition of 73% in radicle growth when evaluating the antagonistic effect of native isolations of *Trichoderma* spp. on the growth of *F. subglutinans*, similar to the results of this study. On the other hand, Jagraj *et al.* (2018) reported 75.9% for *F. oxysporum* against *T. harzianum*, higher than *T. viride* and *T. koningii*, with 67.7 and 55.6% respectively for strains isolated from tomato plants.

Reyes *et al.* (2008) noted that one of the significant characteristics of *Trichoderma* is its high growth rate, and the secretion of secondary metabolites of a different nature, which slow down the growth rates of other competitors. In addition, mycoparasitism is another action mechanism of the genus *Trichoderma*. In this case, swellings were observed in macroconidia and hyphae, as well as the breaking of septum, the presence of granulations and the vacuolization of hyphae by *T. harzianum* (Figure 4b), reaffirming the high mycoparasitic capacity of strain T-H4. Duarte-Leal *et al.* (2018) observed mycoparasitism between the

de espacio y nutrientes. La reducción en la tasa de crecimiento en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagonista de *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). En el presente estudio, el crecimiento de *Fusarium* sp. en confrontación con la cepa T-H4 fue claramente inhibido a partir del día 5 (Figura 3a). Al evaluar el PICR se detectaron diferencias significativas ( $P \leq 0,0001$ ) en la prueba de *t* de student, con un valor de  $t = 92.57$ . El PICR fue de 76.24% (Figura 4b), valor que se clasifica en la clase II (Figura 4a) de acuerdo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982). Michel-Aceves *et al.* (2005), reportan el 73% de inhibición de crecimiento radicular al evaluar el efecto antagonista de aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *F. subglutinans*, resultados similares en el presente estudio. Por otro lado, Jagraj *et al.* (2018) reportan un valor de 75.9% para *F. oxysporum*

hyphae of *T. asperellum* (Ta.25), where it penetrated and caused the lysis of the hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50), as reported in the present investigation. The results confirmed the notifications by González *et al.* (2012) and Hyder *et al.* (2017) regarding the enzymatic degradation of the cell wall of the phytopathogenic fungi during the mycoparasitic action, which causes lysis and thus the disorganization of the cytoplasmic content which, according to these authors, is related to the action of the enzymes chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,6-glucanases,  $\alpha$ -1,3-glucanases and proteases excreted by *Trichoderma* spp. Additionally, León *et al.* (2012) observed strangulation and the lysis of the walls of the hyphae, followed by a disintegration and degradation of the cell walls of *Fusarium* sp. when confronting strains *Tb111* and *Tc241* of *Trichoderma* spp.



**Figura 3.** Comparación del crecimiento micelial y PICR. a) Crecimiento de *Fusarium* sp. en presencia y ausencia de *T. harzianum* b) Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *Fusarium* sp. a 10 días de la inoculación en presencia y ausencia de *T. harzianum*. \*Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de *t* de student ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3.** Comparison of mycelial growth and PICR. a) Growth of *Fusarium* sp. in the presence and absence of *T. harzianum* b) Percentage of inhibition of radial growth (PICR) of *Fusarium* sp. 10 days after inoculation in the presence and absence of *T. harzianum*. \*Means with different letters indicate significant differences with the Student's *t* test ( $p \leq 0.05$ ).

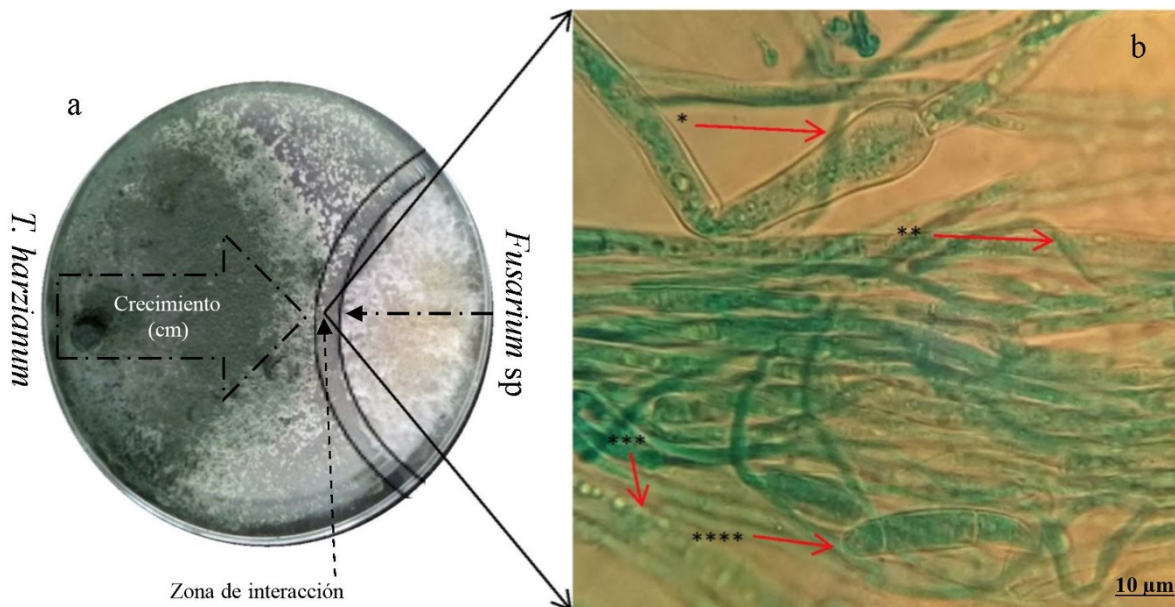


Figura 4. a) Antagonismo de la cepa T-H4 de *T. harzianum* frente a *Fusarium sp.*, donde se observa una clase II en la escala de Bell *et al.* (1982), b) Micoparasitismo de *T. harzianum* sobre las hifas y conidios de *Fusarium sp.*, \* hinchamiento de hifa, \*\* enrollamiento de hifa, \*\*\* granulaciones dentro de hifa, \*\*\*\* hinchamiento de macroconidio.

Figure 4. a) Antagonism of strain T-H4 of *T. harzianum* against *Fusarium sp.*, showing type II in the scale by Bell *et al.* (1982), b) Mycoparasitism of *T. harzianum* on the hyphae and conidia of *Fusarium sp.*, \* swelling of the hypha, \*\* curling of the hypha, \*\*\* granulations inside the hypha, \*\*\*\* swelling of the macroconidia.

frente a *T. harzianum*, mayor a *T. viride* y *T. koningii* con 67.7 y 55.6% respectivamente, esto para cepas aisladas de plantas de jitomate.

Reyes *et al.* (2008), notificaron que una de las características significativas de *Trichoderma* es su elevada velocidad de crecimiento, y la secreción de metabolitos secundarios de diferente naturaleza, que frenan el crecimiento de otros competidores. Asimismo, el micoparasitismo es otro de los mecanismos de acción del género *Trichoderma*. En este caso se logró observar hinchamientos en macroconidias e hifas, así como ruptura de septos, presencia de granulaciones y vacuolización de hifas por *T. harzianum* (Figura 4b), esto reafirma la elevada capacidad micoparasítica de la cepa T-H4. Duarte-Leal *et al.* (2018) observaron micoparasitismo entre hifas de *T. asperellum* (Ta.25), donde penetró y causó lisis en hifas de *Fusarium oxysporum* f.

The hyphal interactions that intervene in the parasitism are measured by the enzymatic activity of the antagonist, which allows the penetration, deformation, disintegration and death of the hyphae of the pathogen (León *et al.*, 2012), and therefore the strains with a high enzymatic potential tend to have a greater mycoparasitic effect (González *et al.*, 2012); herein lies the importance of the selection of strains with various types of hyphal interactions.

Antagonism tests reflect the capacity and genetic variability of the antagonist and the phytopathogen to resist antagonism and perform a preliminary selection of the most efficient antagonistic strains to be evaluated under field conditions, as well as to complement and determine its ability exercised for the biocontrol (Morales *et al.*, 2020).

*Fusarium sp.* was identified as being related to basal rot in bulbs from onions (*Allium cepa*) of the

sp. *ciceri* (F-50) como lo reportado en la presente investigación. Los resultados corroboraron lo notificado por González *et al.* (2012) y Hyder *et al.* (2017), sobre la degradación enzimática de la pared celular de los hongos fitopatogénicos durante la acción micoparasítica, que causa lisis y con ello la desorganización del contenido citoplasmático que, según estos autores, está relacionada con la acción de las enzimas quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas,  $\beta$ -1,6-glucanasas,  $\alpha$ -1,3-glucanasas y proteasas excretadas por *Trichoderma* spp. Además, León *et al.* (2012) observaron presencia de estrangulamiento y lisis de las paredes de las hifas, seguidas de una desintegración y degradación de las paredes celulares de *Fusarium* sp., al enfrentarse a las cepas Tb111 y Tc241 de *Trichoderma* spp.

Las interacciones hifales que intervienen en el parasitismo son mediadas por la actividad enzimática del antagonista, que permite la penetración, deformación, desintegración y muerte de las hifas del patógeno (León *et al.*, 2012), por lo que aquellas cepas que exhiben un alto potencial enzimático tienden a poseer un mayor efecto micoparasítico (González *et al.*, 2012); de ahí la importancia de la selección de cepas con varios tipos de interacciones hifales.

Las pruebas de antagonismo reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista y del fitopatógeno para resistir el antagonismo y realizar una selección preliminar de las cepas antagónicas más eficientes para ser evaluadas en condiciones de campo, así como para complementar y determinar su capacidad biocontroladora (Morales *et al.*, 2020).

Se logró identificar a *Fusarium* sp. asociado a la podredumbre basal, proveniente de bulbos del cultivo de cebolla (*Allium cepa*) variedad Crystal white, ubicada en La Soledad, perteneciente al municipio de Chietla del estado de Puebla, México. La cepa de *T. harzianum* T-H4 mostró adecuada

Crystal white variety, found in La Soledad, which belongs to the municipal area of Chietla, in the state of Puebla, Mexico. The *T. harzianum* strain T-H4 displayed an adequate antagonistic ability *in vitro* against *Fusarium* sp., with a PICR of 76.24%. It is necessary to verify the antagonistic capacity of *T. harzianum* T-H4 in the field against strain CFbC as well as its identification with the elongation factor of translation (EF1 $\alpha$ ) in order to recommend its use as an alternative for the onion farmers of the area.

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

capacidad antagónica *in vitro* frente a *Fusarium* sp., con un PICR de 76.24%. Es necesario verificar en campo la capacidad antagonista de *T. harzianum* T-H4 frente a la cepa CFbC, así como su identificación por el factor de elongación de la traducción 1 α (EF1 α), para así recomendar su uso como alternativa a los productores de cebolla de la región.

LITERATURA CITADA

- Abdalla SA, Abdelkhalek AA, Khaled AE, Abdelsalam NR and Hafez EE. 2019. Screening of fungal diseases infecting onion plants in Lower Egypt. Middle East Journal of Agriculture Research 8 (1): 200-210. <http://www.currenresweb.com/mejar/mejar/2019/200-210.pdf>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Hernández EO, Gayosso EM, Valenzuela NL and Cureño HJB. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Andrade-Hoyos P, Silva-Rojas HV and Romero-Arenas O. 2020. Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado. Plants e1220. <https://doi.org/10.3390/plants9091220>
- Barnett HL and Hunter BB. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. USA. 241 p.
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>

- Dauda WP, Alao SEL, Zarafi AB and Alabi O. 2018. First report of die-back disease of onion (*Allium cepa* L.) induced by *Fusarium equiseti* (Mart) Sacc in Nigeria. International Journal of Plant and Soil Science 21(3): 2320-7035. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2018/38339>
- Duarte-Leal Y, Pozo-Martínez L and Martínez-Coca B. 2018. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt and Nirenberg frente aislados de *Fusarium* spp. Revista de Protección Vegetal 33(1): 1-10. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&id=S1010-27522018000100005
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2020. Agriculture production and Trade Statistics. In Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Gan and Wickings K. 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. Agriculture, Ecosystems and Environment 246: 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.014>
- García E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de geografía. Universidad Autónoma de México. México. 170 p.
- González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, Miranda I and Peteira B. 2012. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. Biotecnología Aplicada 29(1): 12-16. <https://www.medigraphic.com/pdfs/biotecapl/ba-2012/ba121b.pdf>
- Groenewald S, Van den Berg N, Marasas WF and Viljoen A. 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Australasian Plant Pathology 35(4): 1-40. <https://doi.org/10.1071/AP06041>
- Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L, Roucco M, Lanzuise S, Woo S and Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28(2): 87-9. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61218468002>
- Haapalainen M, Latvala S, Kuivainen E, Qiu Y, Segerstedt M and Hannukkala AO. 2016. *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. Plant Pathology 65(8): 1310-1320. <https://doi:10.1111/ppa.12521>
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R and Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences 35(1): 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hyder S, Inam-ul-Haq M, Bibi S, Humayun A, Ghuffar S and Iqbal S. 2017. Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent. Journal of Entomology and Zoology Studies 5(4): 214-222. <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartC/5-3-244-140.pdf>
- Iturbide-Zuñiga AS, Colinas-León MTB, Lozoya-Saldaña H, Medina-Moreno SA and Ayala-Arreola J. 2017. Evaluación *in vitro* de extractos del género *Lilium* para el control de *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 611-622. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1609-6>
- Jagraj S, Kumar V, Srivastava S, Kumar A and Singh VP. 2018. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing Tomato wilt. Plant Pathology Journal 17(2): 59-64. <https://doi.org/10.3923/ppj.2018.59.64>
- Ji SH, Kim TK, Keum YS and Chun SC. 2018. The major post-harvest disease of onion and its control with Thymol fumigation during Low Temperature Storage. Mycobiology 46(3): 242-253. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1505245>
- Joaher DT, Aumeeruddy M, Zakariyyah TZ, Gokhan Z, Kannan RR, Shunmugiah KP and Mahomoodally MF. 2019. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review, Critical Reviews. Food Science and Nutrition 59 (sup1): S39-S70. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1499074>
- Kiehr M and Delhey R. 2015. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano, Argentina, 2005, p. HV13. Ciudad General Roca, Argentina.
- León RA, Pino SC, Martínez B, Liriano R and Núñez DB. 2012. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* y su efecto antagonista frente a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. Centro Agrícola 39(2): 43-48. <http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/html/v39n2/body/cag08212.htm>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. 387 p.
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Darío R, Rebollo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R and Ariza-Flores R. 2005. Actividad micoparasítica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) P. E. Nelson, T. A. Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlechtend.: Fr. Revista Mexicana de Fitopatología 23(3): 253-261. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/FullTextPDF/2007/20073103350.pdf>
- Montes-Belmont R, Nava-Juárez RA, Flores-Moctezuma HE and Mundo-Ocampo M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 300-304. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221309>
- Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia de Ita, MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2019. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. Revista Mexicana de Fitopatología 38(3): 434-449. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-7>
- Nawrocka J, Szczech M and Malolepsza U. 2018. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. Plant Protection Science 54(1): 17-23. <https://doi:10.17221/126/2016-PPS>
- Nei M and Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York. USA. 352 p.
- Organization of Economical Co-operation and Development (OECD). 1984. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 15 p.

- Pérez-Torres E, Bernal-Cabrera A, Milanés-Virelles P, Sierra-Reyes Y, Leiva-Mora M, Marín-Guerra S and Montegudo-Hernández O. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* 30(1): 17-26. <https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/2707/1690>
- Reyes Y, Martínez B and Infante D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista Protección Vegetal* 23(2): 112-117. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000300010&lng=en&tlng=es.
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-de-los-Santos G, Vaquera-Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress* 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>
- Romero-Arenas O, Amaro LJ, Damián HM, Valencia de Ita MA, Rivera A and Huerta LM. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *ITEA* 113(4): 313-324. <http://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Salazar-González C, Serna-Cock L and Gómez-López E. 2016. Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agronomía Mesoamericana* 27(2): 277-285. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
- Samson RA, Visagie CM and Houbraken J. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sanogo S and Zhang J. 2015. Resistance sources, resistance screening techniques and disease management for *Fusarium* wilt in cotton. *Euphytica* 207(2): 255-271. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1532-y>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2020. Atlas Agroalimentario. 1080-2020.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. USEPA 712-C-96-154; OPPTS 850.4200. 17 pp.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press 38: 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zeravakis G, Philippoussis A, Ioannidou S and Diamantopoulou P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia microbiológica* 46(3): 231e. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>

Etiology of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico

Etiología de la costra negra del nopal (*Opuntia ficus-indica*) en México

Bruno Laureano-Ahuelicán, ¹Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; **Mag-nolia Moreno-Velázquez, Lervin Hernández-Ramos**, ²Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Unidad Integral de Diagnóstico, Servicios y Constatación, Carretera Federal México-Pachuca Km 37.5, Tecámac, Estado de México, CP 55740; **Dionicio Alvarado-Rosales, Esther Martínez-Domínguez**, CONSULCERT Asociados S.C., Tercera Cerrada de la Noria, San Bernardino, Texcoco, México, CP 56260; **Luz de Lourdes Saavedra-Romero, Andrés Quezada-Salinas*.**

*Autor para correspondencia: andresqs@colpos.mx

Recibido: 18 de Enero, 2021.

Aceptado: 30 de Marzo, 2021.

Laureano-Ahuelicán B, Moreno-Velázquez M, Hernández-Ramos L, Alvarado-Rosales D, Martínez-Domínguez E, Saavedra-Romero LL and Quezada-Salinas A. 2021. Etiology of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 329-338.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-3>

Primera publicación DOI: 12 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 12, 2021.

Resumen. Para identificar el agente causal de la costra negra del nopal (*Opuntia ficus-indica*) se aislaron e identificaron morfológicamente los hongos asociados a la enfermedad. El estudio se realizó a partir de cladodios con síntomas característicos de la enfermedad colectados en la localidad de Santa Cecilia Clavijero, en el municipio de San Juan Ixcaquixtla, Puebla. Los hongos asociados a la

Abstract. To identify the agent of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), the fungi associated with the disease were isolated and morphologically identified. The study was carried out from cladodes with characteristic symptoms of the disease collected in the town of Santa Cecilia Clavijero, in the municipality of San Juan Ixcaquixtla, Puebla. The fungi associated with the disease were identified as: *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* and *Didymella glomerata*. To demonstrate their pathogenicity, the fungi were inoculated individually and in their combinations in six-month-old cladodes. Symptoms started 50 days after inoculation. The inoculation method that allowed the reproduction of the symptoms was the injection of a suspension at a concentration of 6×10^3 conidia mL⁻¹ of the mixture of the three fungi; cladodes inoculated with one and two fungi, did not result in the development of the disease. C.

enfermedad se identificaron como: *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* y *Didymella glomerata*. Para demostrar su patogenicidad, los hongos se inocularon individualmente y en sus combinaciones en cladodios de seis meses de edad. Los síntomas iniciaron 50 días después de la inoculación. El método de inoculación que permitió la reproducción de los síntomas fue la inyección de una suspensión a una concentración de 6×10^3 conidios mL^{-1} de la mezcla de los tres hongos; cladodios inoculados con uno y dos hongos, no resultó en el desarrollo de la enfermedad. *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata* son los agentes causales de la costra negra del nopal siendo este el primer reporte de estos patógenos en el cultivo del nopal.

Palabras clave: Patogenicidad, Postulados de Koch, inoculación, cladodios.

El nopal (*Opuntia* spp.) se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano, principalmente en la parte central, pertenece a la familia Cactaceae en donde la especie más importante debido a su valor económico es *O. ficus-indica*, la cual se cultiva tanto para la producción de frutos (tuna), como para consumo de cladodios (nopalitos) (Caruso *et al.*, 2010). Los usos son diversos, en general se utiliza en la industria alimenticia, medicinal y química, presenta un alto valor ecológico y simbólico (Márquez-Berber *et al.*, 2012). A nivel mundial, México es el principal productor de nopal verdura (*O. ficus-indica*), con una superficie sembrada de 12,799 ha. Las principales entidades productoras son: Morelos con 4,107 ha, Ciudad de México con 2,482, Estado de México con 1,016 y Tamaulipas con 957 ha (SIAP, 2019). Sin embargo, como muchos otros cultivos, la productividad de este es afectada por varios factores, entre los

cladosporioides, *A. hesperidica* and *D. glomerata* are the causative agents of the nopal black scab, this being the first report of these pathogens in the nopal cultivation.

Key words: Pathogenicity, Koch's postulates, inoculation, cladodes.

The prickly pear (*Opuntia* spp.) is widely distributed throughout the American continent, mainly in the central area. It belongs to the Cactaceae family, in which the most important species due to its economic value is found: *O. ficus-indica*, which is planted for its fruit (tuna), as well as for its cladode (nopal) (Caruso *et al.*, 2010). Its diverse uses include production for the food, medical and chemical industries, and it has a high environmental and symbolic value (Márquez-Berber *et al.*, 2012). Mexico is the main producer of prickly pear (*O. ficus-indica*), with a surface of 12,799 ha planted with this crop. The main producing areas are Morelos, with 4,107 ha; Mexico City, with 2,482; State of Mexico, with 1,016 ha and Tamaulipas, with 957 ha (SIAP, 2019). However, like many other crops, its productivity can be affected by several factors, including phytosanitary factors. In the municipality of San Juan Ixcaquixtla, Puebla, the cladodes have been reported with symptoms of dark brown to black spots, which only affect the surface (cuticle, epidermis and part of the parenchyma). At the end of the cycle of the disease, the affected areas can be detached, showing scars and deformities on the cladode. This disease has been called black scab, and it causes deformities and a reduction of the photosynthetic area of the prickly pear; its incidence was of approximately 60%. Similar symptoms, cause by tissue necrosis, are caused by different pathogens in the prickly pear, including

que se encuentran los de índole fitosanitaria. En el municipio de San Juan Ixcaquixtla, Puebla se ha reportado la presencia de cladodios con síntomas de manchas de color café oscuro a negro, las cuales únicamente afectan la parte superficial (cutícula, epidermis y parte del parénquima); al término del ciclo de la enfermedad, las partes afectadas pueden desprenderse dejando ver cicatrices y deformaciones sobre el cladodio; dicha enfermedad se ha denominado como costra negra, la cual causa deformación y reducción del área fotosintética del nopal, con incidencia de alrededor del 60%. Síntomas similares, debidos a necrosis de tejido son causados por diferentes patógenos en nopal entre los que se incluyen a *Fusarium sporotrichioides*, *Lasioidiplodia theobromae*, asociados a la necrosis de cladodios (Swart y Kriel, 2002); *Pseudocercospora opuntiae*, agente causal de la mancha negra del nopal (Ayala-Escobar *et al.*, 2006; Quezada-Salinas *et al.*, 2006); *Fusarium lunatum* (Flores-Flores *et al.*, 2013) y *Pectobacterium* spp. (Torres-Bojórquez *et al.*, 2016). Los síntomas observados en San Juan Ixcaquixtla no coinciden con ninguno de los reportados por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar el agente causal de la costra negra del nopal.

En la localidad de Santa Cecilia Clavijero, municipio de San Juan Ixcaquixtla (18° 26' 25.80" N, 97° 47' 35.63" O) Puebla, durante 2018-2020 se recolectaron cladodios con diferentes grados de avance de la enfermedad denominada costra negra. De tejido sintomático se cortaron trozos de 1 cm² de la zona de transición tejido enfermo-sano (conjunto cutícula-epidermis-colénquima). Los trozos se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) a 1% durante 1 min, se lavaron dos veces con agua destilada esterilizada, se secaron sobre papel secante estéril y se sembraron en cámara húmeda y en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) para ser incubados a 25±2 °C durante cinco días.

Fusarium sporotrichioides, *Lasioidiplodia theobromae*, related to the necrosis of cladodes (Swart and Kriel, 2002); *Pseudocercospora opuntiae*, causal agent of the black scab on prickly pear (Ayala-Escobar *et al.*, 2006; Quezada-Salinas *et al.*, 2006); *Fusarium lunatum* (Flores-Flores *et al.*, 2013) and *Pectobacterium* spp. (Torres-Bojórquez *et al.*, 2016). The symptoms observed in San Juan Ixcaquixtla do not coincide with any reports, therefore the aim of this investigation was to identify the causal agent on black scab on prickly pear.

In the town of Santa Cecilia Clavijero, in the municipality of San Juan Ixcaquixtla (18° 26' 25.80" N, 97° 47' 35.63" W) Puebla, during 2018-2020, cladodes were collected with different degrees of progress of the disease called black scab. Pieces of tissue with symptoms, 1 cm² in size, were cut from the diseased-healthy tissue transition (cuticle-epidermis-collenchyma). The pieces were disinfested with a 1% sodium hypochlorite (NaOCl) solution for 1 min, washed twice with sterilized distilled water, dried on sterilized drying paper, and planted in a wet chamber in a potato-dextrose-agar (PDA) medium and later incubated at 25±2 °C for five days. The fungal cultures developed and the structures formed in the chamber were transferred to a potato-dextrose-agar medium (natural: potato 200 g, dextrose 14 g, agar 18 g, water 1 L) with added lactic acid (1.5 mL at 10%) and incubated under continuous white fluorescent light at 25±2 °C.

The fungi were purified with monoconidial cultures in water-agar at 2% (W/V). The induction of reproductive structures was carried out in PDA at 25±2 °C. The identification and morphological description of the isolations was carried out with temporary and permanent preparations which helped observe the morphology and the size of 100 spores of each isolation under a compound microscope at a magnification of 40X. To determine the species,

Las colonias de hongos desarrolladas y las estructuras formadas en cámara húmeda se transfirieron a medio papa-dextrosa-agar (natural: papa 200 g, dextrosa 14 g, agar 18 g, agua 1 L) adicionado con ácido láctico (1.5 mL al 10%), y se incubaron bajo luz blanca fluorescente continua a 25 ± 2 °C.

Los hongos se purificaron mediante cultivos monoconidiales en agua-agar al 2% (W/V). La inducción de estructuras reproductivas se llevó a cabo en PDA a 25 ± 2 °C. La identificación y descripción morfológica de los aislamientos se realizó con preparaciones temporales y permanentes que se observaron bajo microscopio compuesto (Virtue-N), la morfología y tamaño de 100 esporas de cada uno de los aislamientos a una magnificación de 40X. Para la determinación de la especie se siguieron claves taxonómicas y comparación con reportes existentes en la literatura científica (Boerema, 1993; Bensch *et al.*, 2010; Bensch *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015; Nam *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2018; Mapook *et al.*, 2020).

Se plantaron cladodios sanos en macetas con suelo estéril y se conservaron durante seis meses en un invernadero del Colegio de Postgraduados, México; a una temperatura de 24 ± 3 °C y 70% de humedad relativa. Debido a que de manera consistente se aislaron tres hongos: *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* y *Didymella glomerata* de los mismos trozos sembrados en medio de cultivo, la inoculación se realizó mediante dos métodos: por aspersión e inyección de conidios. Con la cámara de Neubauer se prepararon suspensiones a una concentración de 2×10^3 , 3×10^3 y 6×10^3 conidios mL^{-1} para cada uno de los tres hongos aislados. La aplicación se realizó con aspersores manuales previamente desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% y tres lavados con agua destilada estéril; y jeringa hipodérmica estéril, a cladodios previamente lavados con agua destilada estéril por triplicado. Los tratamien-

taxonomic keys were followed and comparisons were made with reports from scientific literature (Boerema, 1993; Bensch *et al.*, 2010; Bensch *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015; Nam *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2018; Mapook *et al.*, 2020).

Healthy cladodes were planted in sterilized soil and kept for six months in a greenhouse in the Colegio de Postgraduados, Mexico, at a temperature of 24 ± 3 °C and a relative humidity of 70%. Three fungi (*Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* and *Didymella glomerata*) were consistently isolated from the pieces planted in the culture medium and inoculation was carried out following two methods, by sprinkling and injection of conidia. With a Neubauer chamber, suspensions were prepared at a concentration of 2×10^3 , 3×10^3 and 6×10^3 conidia mL^{-1} for each of the three fungi isolated. Manual sprinklers, previously disinfected with a 1.5% hypochlorite solution, were used to apply the suspension, along with a sterilized hypodermic syringe, on cladodes previously washed three times with sterilized distilled water. The inoculated treatments consisted of *C. cladosporioides* at 6×10^3 conidia mL^{-1} ; *A. hesperidica*, 6×10^3 conidia mL^{-1} ; *D. glomerata*, 6×10^3 conidia mL^{-1} ; *C. cladosporioides*, 3×10^3 conidia mL^{-1} + *A. hesperidica*, 3×10^3 conidia mL^{-1} ; *C. cladosporioides*, 3×10^3 conidia mL^{-1} + *D. glomerata*, 3×10^3 conidia mL^{-1} ; *A. hesperidica*, 3×10^3 conidia mL^{-1} + *D. glomerata*, 3×10^3 conidia; *C. cladosporioides*, 2×10^3 conidia mL^{-1} + *A. hesperidica*, 2×10^3 conidia mL^{-1} + *D. glomerata*, 2×10^3 conidia mL^{-1} ; sterilized distilled water.

The injection method consisted in injecting 1 mL of each treatment subepidermally, whereas for sprinkling, 4 mL of inoculant were sprinkled on both sides of the cladode. Each treatment consisted of three repetitions (three cladodes) with a completely random design. The experiment was carried out twice. The inoculated cladodes were kept in a

tos inoculados fueron: *C. cladosporioides* a 6×10^3 conidios mL^{-1} ; *A. hesperidica* 6×10^3 conidios mL^{-1} ; *D. glomerata* 6×10^3 conidios mL^{-1} ; *C. cladosporioides* 3×10^3 conidios mL^{-1} + *A. hesperidica* 3×10^3 conidios mL^{-1} ; *C. cladosporioides* 3×10^3 conidios mL^{-1} + *D. glomerata* 3×10^3 conidios mL^{-1} ; *A. hesperidica* 3×10^3 conidios mL^{-1} + *D. glomerata* 3×10^3 conidios; *C. cladosporioides* 2×10^3 conidios mL^{-1} + *A. hesperidica* 2×10^3 conidios mL^{-1} + *D. glomerata* 2×10^3 conidios mL^{-1} ; agua destilada estéril.

El método de inyección consistió en inyectar de manera subepidermal 1 mL de cada tratamiento, mientras que para el método de aspersión se asperjaron 4 mL de inóculo por ambas caras del cladodio. Cada tratamiento consistió de tres repeticiones (tres cladodios) con un diseño completamente al azar. El experimento se realizó por duplicado. Los cladodios inoculados se mantuvieron en invernadero en el Colegio de Postgraduados a una temperatura de 24 ± 3 °C y 70% de humedad relativa hasta el desarrollo de síntomas. Los organismos que indujeron los síntomas de costra negra fueron reaislados para verificar su identidad y cumplir con los Postulados de Koch. De cladodios inoculados con síntomas similares a los observados en campo, se cortaron trozos de tejido de 0.5 cm, se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada, se secaron y se sembraron en cajas de Petri con medio PDA natural para ser incubados bajo luz blanca fluorescente continua a 25 ± 2 °C.

En campo, los síntomas causados por la costra negra, se caracterizaron por el desarrollo de manchas de 1 a 4 cm de diámetro, inicialmente de color café claro, las cuales con el tiempo se tornan de color café oscuro a negro, de consistencia húmeda y delimitada por tejido muerto de color claro. Cuando las manchas coalescieron, se desarrollaron áreas de gran tamaño que abarcaron, en algunos casos, hasta el 70% de la superficie de la cara de un clado-

greenhouse in the Colegio de Postgraduados at a temperature of 24 ± 3 °C and a relative humidity of 70% until symptoms developed. The organisms that induced the black scab symptoms were re-isolated to verify their identity and comply with Koch's postulates. Pieces of 0.5cm in size were cut from the cladodes inoculated with symptoms similar to those observed on the field, they were washed three times with sterilized distilled water, dried, planted in Petri dishes with a natural PDA medium, and incubated under continuous white fluorescent light at 25 ± 2 °C.

On the field, the symptoms caused by black scab were characterized by the development of spots, 1 to 4 cm in diameter, initially light brown in color and which turn dark brown to black in time, with a moist consistency and surrounded by dead light brown tissue. When the spots coalesced, large areas developed which, in some cases, covered up to 70% of the surface of the face of a cladode. The lesions only affected the cuticle and epidermis, but not any internal tissues (collenchyma, chlorenchyma, storage parenchyma cells, vascular system and medulla). In advanced stages, the affected part detaches and falls to the ground, and this causes deformities and damages in the superficial photosynthetic area.

Out of the total of isolations obtained from symptoms of the black scab, three fungus species were identified and morphologically characterized: 1) *Cladosporium cladosporioides* developed maroon-olive green cultures on the front, and almost black on the reverse; mainly immersed mycelia, but also aerial mycelia; lone conidiophora, cylindrical, pale to maroon-olive green in color, micronematous, smooth, occasionally warty, arising terminally from ascending hyphae and not branched, or occasionally branched, one of the top septa slightly darkened, where ramoconidia are formed; conidia in long, branched chains that

dio. Las lesiones únicamente afectaron a la cutícula y epidermis sin afectar a los tejidos internos (colénquima, clorénquima, células del parénquima de almacenamiento, sistema vascular y médula). En estados avanzados, la parte afectada se desprende y cae al suelo, esto provoca deformaciones y daños en el área superficial fotosintética.

Del total de aislamientos obtenidos de síntomas de la costra negra, se identificaron y caracterizaron morfológicamente tres especies de hongos: 1) *Cladosporium cladosporioides* desarrolló colonias de color marrón-olivo por el frente y casi negras por el reverso; micelio inmerso principalmente, pero también aéreo; conidióforos solitarios, cilíndricos, de color pálido a marrón olivo, micronematosos, lisos, ocasionalmente verrugosos, surgiendo terminalmente de hifas ascendentes y no ramificados u ocasionalmente ramificados, uno de los septos superiores ligeramente oscurecido, donde se formaron los ramoconidios; conidios en cadenas largas y ramificadas que se desarticulan fácilmente, en su mayoría aseptados, elípticos a limoniformes, pálidos a marrón olivo y lisos, de $3.0\text{-}5.5 \times 2.5\text{-}3.0 \mu\text{m}$, estas características fueron consistentes con las reportadas por Bensch *et al.* (2010), Bensch *et al.* (2012) y Nam *et al.* (2015). 2) *Aplosporella hesperidica* formó colonia con micelio ligeramente elevado, con hifas aéreas blancas en la superficie, extendiéndose desde el centro, anverso de la colonia de color blanco. Conidiomata de $398 \times 516 \mu\text{m}$, semi-inmerso, erumpente, uniloculado, en grupos, globoso, marrón oscuro. Conidióforos reducidos a células conidiogénicas. Células conidiogénicas hialinas, holoblásticas, oblongas o cilíndricas a ampuliformes. Conidios $18 \times 12 \mu\text{m}$, de color marrón, aseptados, elipsoides a ovalados. Las características corresponden con las reportadas para esta especie por Mapook *et al.* (2020). 3) En *Didymella glomerata*, las colonias inicialmente fueron de color blanco, posteriormente se tornaron de color

disarticulate easily, mostly unseptated, elliptical to lemon-shaped, pale to maroon-olive green and smooth, sized $3.0\text{-}5.5 \times 2.5\text{-}3.0 \mu\text{m}$, these characteristics were consistent with reports by Bensch *et al.* (2010), Bensch *et al.* (2012) and Nam *et al.* (2015). 2) *Aplosporella hesperidica* showed culture with slightly elevated mycelia, with white aerial hyphae on the surface, extending from the center, obverse of the white culture. Conidiomata, sized $398 \times 516 \mu\text{m}$, semi-immersed, eruptive, uniloculate, in groups, globose, dark maroon. Conidiophores reduced to conidiogenic cells. Conidiogenic hyalin cells, holoblastic, oblong or cylindrical to bulbous. Conidia sized $18 \times 12 \mu\text{m}$, maroon, septated, ellipsoidal to oval. Characteristics correspond to those reported for this species by Mapook *et al.* (2020). 3) In *Didymella glomerata*, cultures were initially white in color but later became olive green to dark maroon in color. Conidia, developed in ostiolate pycnidia, ellipsoid, unicellular, hyaline, sized $5.0 \times 3.0 \mu\text{m}$. Pycnidia, dark brown in color, sized $70 \times 90 \mu\text{m}$. These morphological characteristics coincided with reports by Boerema (1993), Chen *et al.* (2015) and Pan *et al.* (2018).

Symptoms began appearing in the cacti 50 d after inoculation. The only cladodes with symptoms were those inoculated with the method of conidia injection and with the combination of all three fungi, namely *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata*. Neither the cladodes inoculated with one and the combination of two fungi nor the control presented any symptoms. These began with the appearance of light brown lesions, 2 to 6 mm in diameter (Figure 1A). For the next two weeks, the lesions acquired a dark brown to black color, and were surrounded by dead, light colored tissue (Figure 1B and C); these symptoms corresponded to those observed on the field in the municipality of San Juan Ixcaquixtla, Puebla. The reisolations

verde olivo a marrón oscuro. Conidios, desarrollados en picnidios ostiolados, de forma elipsoide, unicelulares, hialinos, de $5.0 \times 3.0 \mu\text{m}$. Picnidios de color café oscuro, de $70 \times 90 \mu\text{m}$. Estas características morfológicas coincidieron con lo reportado por Boerema (1993), Chen *et al.* (2015) y Pan *et al.* (2018).

En las plantas de nopal inoculadas, la aparición de síntomas se inició a los 50 d después de la inoculación. Los cladodios que presentaron síntomas fueron únicamente aquellos inoculados mediante el método de inyección de conidios y mediante la combinación de los tres hongos, es decir, *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata*. Los cladodios inoculados con uno y la combinación de dos hongos, así como el testigo no presentaron síntomas. Los síntomas iniciaron con la aparición de lesiones de color café claro de 2 a 6 mm de diámetro (Figura 1A). Durante las siguientes dos semanas, las lesiones adquirieron un color de café oscuro a negro y delimitadas con tejido muerto de color claro (Figura 1B y C); estos síntomas correspondieron a los observados en campo en el municipio de San Juan Ixcaquixtla, Puebla. Los reaislamientos obtenidos de plantas inoculadas coincidieron con las características culturales y morfológicas de los aislamientos de plantas colectadas en campo, demostrándose así que *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata* son los agentes causales de la costra negra en cladodios de nopal.

Cladosporium cladosporioides es el agente causal de la necrosis floral, pudrición y caída de frutos juveniles del papayo (*Carica papaya*) en México (Vásquez *et al.*, 2012); la mancha de hollín en mandarina (*Citrus reticulata*) en Japón (Tashiro *et al.*, 2013) y la pudrición del fruto en zapote mante (*Pouteria campechiana*) en México (Nabor-Romero *et al.*, 2018). Por otra parte, *A. hesperidica* ha sido reportado como saprófito en ramas muertas de *Citrus aurantium* en India (Rao, 1969) y en ta-

obtain from inoculated plants coincided with the cultural and morphological characteristics of the isolations of plants gathered from the field, thus showing that *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata* are the causal agents of black scab in prickly pear cladodes.

Cladosporium cladosporioides is the causal agent of floral necrosis, rotting and loss of young fruits in papaya tree (*Carica papaya*) in Mexico (Vásquez *et al.*, 2012); sooty mold in tangerines (*Citrus reticulata*) in Japan (Tashiro *et al.*, 2013) and the rotting of fruits in zapote mante (*Pouteria campechiana*) in Mexico (Nabor-Romero *et al.*, 2018). On the other hand, *A. hesperidica* has been reported as a saprophyte in dead *Citrus aurantium* branches in India (Rao, 1969) and dead *Chromolaena odorata* stalks (Mapook *et al.*, 2020), and as a pathogen causing the early rot of the stem of *Citrus sinensis* in Zimbabwe (Yang *et al.*, 2017). Finally, *D. glomerata*, has been reported as a pathogen, causing leaf smut in pistachio (*Pistacia vera*) in the United States (Moral *et al.*, 2018) and black stain on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China (Pan *et al.*, 2018), showing the impact of these pathogens on different economically important species. No reports have yet been found on the interaction of these three fungi on the development of the disease on prickly pear or on any other host. Only *C. cladosporioides* was reportedly found to infect cladodes in Brazil (Souza *et al.*, 2010). Due to this, according to scientific literature, this is the first report on *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata* as causal agents of black scab in cacti in Mexico.

The pathogens that coexist in one same host can affect each other through antagonism or benefit through synergy, and in the latter, different interactions have been reported. In *Pisum sativum*, the development of smut increases with the coinfection of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma*



Figura 1. Pruebas de patogenicidad de *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* y *Didymella glomerata* en nopal (*Opuntia ficus-indica*), en condiciones de invernadero. A) Síntomas iniciales, lesiones de color café claro, B) Desarrollo posterior de síntomas, manchas de color café oscuro a negro y delimitadas con tejido muerto de color claro, C) Cladodio con desarrollo de síntomas, cada lesión pertenece a un punto de inoculación mediante la inyección de conidios.

Figura 1. Pathogenicity tests for *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* and *Didymella glomerata* on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), under greenhouse conditions. A) Initial symptoms, light brown lesions, B) Later development of symptoms, light brown to black spots, surrounded by dead light-colored tissue, C) Cladode with symptoms, each lesion represents a point of inoculation with the injection of conidia.

llos muertos de *Chromolaena odorata* (Mapook *et al.*, 2020); y como patógeno causando la pudrición temprana del tallo de *Citrus sinensis* en Zimbabue (Yang *et al.*, 2017). Por último, en el caso de *D. glomerata*, este ha sido reportado como patógeno causando el tizón de la hoja en pistacho (*Pistacia vera*) en Estados Unidos de Norteamérica (Moral *et al.*, 2018) y la mancha negra en kiwi (*Actinidia chinensis*) en China (Pan *et al.*, 2018), evidenciándose el impacto de estos patógenos en diferentes especies

medicaginis var. *pinodella* (Le May *et al.*, 2009); the foliar stain of eucaliptus is caused by numerous species of fungi of the genus *Teratosphaeria* (Crous *et al.*, 2009), and in South Africa, two species -*Teratosphaeria juvenalis* and *T. verrucosa*-coexist on the same leaves, and even on a same stain, causing infection (Crous *et al.*, 2009). In this study, results show that the presence of all three pathogens in the same organ of the plant at the same time leads to the development of the disease and its

de importancia económica. A la fecha no se encontraron reportes de la interacción de estos tres hongos en el desarrollo de enfermedad en nopal ni en algún otro hospedante; únicamente se reporta a *C. cladosporioides* infectando cladodios de nopal en Brasil (Souza *et al.*, 2010). Por lo anterior, de acuerdo a la literatura científica, este es el primer reporte de *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata* como agentes causales de la costra negra en nopal en México.

Los patógenos que coexisten en un mismo hospedante pueden afectarse entre sí a través del antagonismo o beneficiarse con el sinergismo, en este último se han reportado diferentes interacciones, en *Pisum sativum* el desarrollo de tizón se incrementa con la coinfección de *Mycosphaerella pinodes* y *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (Le May *et al.*, 2009); la mancha foliar del eucalipto es un complejo causado por numerosas especies de hongos del género *Teratosphaeria* (Crous *et al.*, 2009), en Sudáfrica se presentan dos especies *Teratosphaeria juvenalis* y *T. verrucosa* que coexisten en las mismas hojas e incluso en una misma mancha causando infección (Crous *et al.*, 2009). En este estudio los resultados mostraron que la presencia de los tres patógenos en el mismo órgano de la planta y en el mismo tiempo propicia el desarrollo de la enfermedad y su reproducción. Como ya se mencionó anteriormente, los tres hongos son responsables de causar síntomas similares; es decir pudrición y necrosis, síntomas que también son característicos en la enfermedad de la costra negra del nopal. En subsecuentes trabajos se sugiere evaluar el intervalo de tiempo en la inoculación, con el objetivo de determinar si es indispensable la inoculación simultánea o cuales son los intervalos de tiempo en la cual se mantienen el carácter infectivo de los hongos *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata*. Debido a que la costra negra representa una amenaza potencial para la producción de fruta

reproduction. As mentioned earlier, the three fungi cause similar symptoms, that is, rot and necrosis, symptoms that are also typical of the black scab disease in prickly pears. In later works, we suggest an evaluation of the time intervals in inoculation, in order to determine if simultaneous inoculation is crucial or which are the time intervals in which the infectious feature of the fungi *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata* are maintained. Due to the fact that black scab is a potential threat to the production of prickly pears and nopal, it is necessary to evaluate different control strategies that help develop management plans. In addition, it is worth highlighting the need for complementary molecular studies to corroborate the identity of the causal agents described in this investigation.

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

y nopal verdura es necesario evaluar diferentes estrategias de control que permitan el desarrollo de planes de manejo. Asimismo, cabe señalar que es de importancia realizar estudios moleculares complementarios para corroborar la identidad de los agentes causales descritos en esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Ayala-Escobar VB, Yanez-Morales MJ, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. Fungal Diversity 21:1-9. <https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/21-1.pdf>
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72:1-401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemsse M, Andersen B, Sumerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U and Crous PW. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides*

- complex (Davidiellaceae, Capnodiales). Studies in Mycology 67(1):1-94. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>
- Boerema GH. 1993. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) - II. Section Peyronellaea. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 15(2):197-221. <https://repository.naturalis.nl/pub/531839>
- Caruso M, Currò S, Las Casas G, La Malfa S and Gentile A. 2010. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus indica* cultivated genotypes and their relation with related species. Plant Systematics and Evolution 290: 85-97. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0351-9>
- Chen Q, Jiang JR, Zhang GZ, Cai L and Crous PW. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. Studies in Mycology 82:137-217. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Crous PW, Groenewald JZ, Summerell BA, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2009. Co-occurring species of Tetratosphaeria on Eucalyptus. Persoonia 22:38-48. <https://doi.org/10.3767/003158509X424333>
- Flores-Flores R, Velázquez-del Valle MG, León-Rodríguez R, Flores-Moctezuma HE and Hernández-Lauzardo AN. 2013. Identification of Fungal Species Associated with Cladode Spot of Prickly Pear and Their Sensitivity to Chitosan. Journal of Phytopathology 161(7-8): 544-552. <https://doi.org/10.1111/jph.12104>
- Le May C, Potage G, Andrivon D, Tivoli B and Outreman Y. 2009. Plant Disease Complex: Antagonism and Synergism Between Pathogens of the Ascochyta Blight Complex on Pea. Journal of Phytopathology 157: 715-721. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01546.x>
- Mapook A, Hyde KD, McKenzie EHC, Jones EBG, Bhat DJ, Jeewon R, Stadler M, Samarakoon MC, Malaithong M, Tanunchai B, Buscot F, Wubet T and Purahong W. 2020. Taxonomic and phylogenetic contributions to fungi associated with the invasive weed *Chromolaena odorata* (Siam weed). Fungal Diversity 101: 1-175. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00444-8>
- Márquez-Berber SR, Torcuato-Calderón C, Almaguer-Vargas G, Colinas-León MT, Gardezi AK. 2012. El sistema productivo del nopal tunero (*Opuntia albicarpa* y *O. megacantha*) en Axapusco, Estado de México. Problemática y alternativas. Revista Chapingo Serie horticultura 8:81-93. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2012000100006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2012000100006&lng=es&tlng=es)
- Moral J, Lichtemberg PSF, Papagelis A, Sherman J and Michailides TJ. 2018. *Didymella glomerata* causing leaf blight on pistachio. European Journal of Plant Pathology 151(4): 1095-1099. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1422-y>
- Nabor-Romero O, Silva-Valenzuela M, Rojas-Martínez RI and Garza-García R. 2018. First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2): 356-362. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1712-1>
- Nam MH, Park MS, Kim HS, Kim TI and Kim HG. 2015. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* Cause Blossom Blight in Strawberry in Korea. Mycobiology 43(3): 354-359. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.354>
- Pan HMY, Chen L, Deng Z, Wang P, Li L and Zhong CH. 2018. First Report of *Didymella glomerata* Causing Black Spot Disease of Kiwifruit in China. Plant Disease 102(12): 2654. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0583-PDN>
- Quezada-Salinas A, Sandoval-Islas JS, Alvarado-Rosales D y Cárdenas-Soriano E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. Agrociencia 40(5): 641-653. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/496/496>
- Rao VG. 1969. Fungi on Citrus from India. Sydowia 23:215-224. [https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia\\_23\\_0215-0224.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_23_0215-0224.pdf)
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2019. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (consulta, diciembre de 2020).
- Souza A, Cordeiro L, Araujo E, Lopes E, Souto F. 2010. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no seminário paraibano. Biotemas 23: 11-20. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n3p11>
- Swart WJ and Kriel WM. 2002. Pathogens associated with necrosis of cactus pear cladodes in South Africa. Plant Disease 86(6): 693. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.693D>
- Tashiro N, Noguchi M, Ide Y and Kuchiki F. 2013. Sooty spot caused by *Cladosporium cladosporioides* in Postharvest Satsuma mandarin grow in heated greenhouses. Journal of General Plant Pathology 79: 158-161. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0430-1>
- Torres-Bojórquez AI, Cervantes-Díaz L, Núñez-Ramírez F, Morales-Maza A y Samaniego-Gámez BY. 2016. Primer reporte de *Pectobacterium* spp. asociada a *Opuntia ficus* en Baja California, México. Idesia 34(4): 69-71. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000015>
- Vásquez-López A, Hernández-Castro E, Mora-Aguilera JA, Nava-Díaz C, Sánchez-García F. 2012. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. Agrociencia 46: 757-767. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/991/991>
- Yang T, Groenewald JZ, Cheewangkoon R, Jami F, Abdollahzadeh J, Lombard L and Crous PW. 2017. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. Fungal Biology 121(4): 322-346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>

# *Verbesina sphaerocephala* extracts promote the development of *Cucumis sativus* and reduce the damage caused by *Meloidogyne incognita*

## Extractos de *Verbesina sphaerocephala* promueven el desarrollo de *Cucumis sativus* y reduce el daño causado por *Meloidogyne incognita*

Ana Paulina Velasco-Ramírez\*, <sup>1</sup>Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; Gil Virgen-Calleros, Laboratorio de Fitopatología, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; Rosalba Mireya Hernández-Herrera, Departamento de Botánica y Zoología, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; Alejandro Velasco-Ramírez<sup>1</sup>, Myriam Patricia Corona-Cervantes<sup>1</sup>, Diana Maday Munguía-Lizalde<sup>1</sup>, Armando Rafael Hernández-Pérez<sup>1</sup>. Autor para correspondencia: pauvela73@hotmail.com

Recibido: 01 de Marzo, 2021.

Aceptado: 13 de Abril, 2021.

Velasco-Ramírez AP, Virgen-Calleros G, Hernández-Herrera RM, Velasco-Ramírez A, Corona-Cervantes MP, Munguía-Lizalde DM and Hernández-Pérez AR. 2021. *Verbesina sphaerocephala* extracts promote the development of *Cucumis sativus* and reduce the damage caused by *Meloidogyne incognita*. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 339-353.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2103-2>

Primera publicación DOI: 23 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 23, 2021.

**Resumen.** Uno de los principales problemas fitosanitarios son los nematodos agalladores del género *Meloidogyne*. El uso de *Verbesina sphaerocephala* podrían sustituir el uso de nematicidas químicos. El objetivo de esta investigación fue probar si extractos acuosos de *V. sphaerocephala* promueven el

**Abstract.** One of the main phytosanitary problems are root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne*. The use of *Verbesina sphaerocephala* could substitute the use of chemical nematicides. The objective of this research was to test whether aqueous extracts of *V. sphaerocephala* promote development and reduce the damage caused by *M. incognita* in *Cucumis sativus*. Seven treatments were evaluated in *C. sativus* plants grown in pots under greenhouse conditions: control plants without nematodes, plants with nematodes, with nematodes + carbofuran, with nematodes + *Trichoderma*, with nematodes + extract of *V. sphaerocephala* (concentration at 10, 15 and 20%). Three evaluations were carried out to estimate plant height, stem diameter, chlorophyll concentration, number of leaves and flowers, length and weight of roots, galling index, root eggs and larvae in the soil. The results showed that the extracts of

desarrollo y reducen los daños ocasionados por *M. incognita* en *Cucumis sativus*. Se evaluaron siete tratamientos en plantas de *C. sativus* crecidas en macetas en condiciones de invernadero: plantas testigo sin nematodos, plantas con nematodos, con nematodos + carbofuran, con nematodos + *Trichoderma*, con nematodos + extracto de *V. sphaerocephala* (concentración al 10, 15 y 20%). Se realizó tres evaluaciones para estimar altura de planta, diámetro de tallo, concentración de clorofila, número de hojas y flores, longitud y peso de raíces, índice de agallamiento, huevos en raíz y larvas en el suelo. Los resultados mostraron que los extractos de *V. sphaerocephala* al 10 y 15% promovieron el crecimiento de las plantas y disminuyeron los índices de agallamiento de las raíces y el número de larvas de *M. incognita* en el suelo. Los extractos de *V. sphaerocephala* puede ser un potencial biológico para minimizar problemas causados por *M. incognita*.

**Palabras claves:** nematodo agallador, bioestimulante de crecimiento, extractos botánicos, capitaneja.

Las plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos contra plagas agrícolas. En particular las plantas con actividad nematicida y sus derivados tienen el potencial de utilizarse en campo y cubrir parte de la demanda de nematicidas químicos. Se han aislado compuestos químicos de varias familias de plantas, particularmente Asteraceae de manera *in vitro* ( $\alpha$ -Terthienyl) (Chitwood, 2002; Oka, 2010, 2012); sin embargo, esos compuestos no han demostrado su efectividad en campo y no se han desarrollado comercialmente (Gommers y Bakker, 1988). *Inula viscosa*, una Asteraceae común en países mediterráneos, ha demostrado tener actividad nematicida debido que en sus brotes produce ácido cóscico y ácido isocóscico compuestos

*V. sphaerocephala* at 10 and 15% promoted the growth of the plants and decreased the root galling indices and the number of larvae of *M. incognita* in the soil. The extracts of *V. sphaerocephala* can be a biological potential to minimize problems caused by *M. incognita*.

**Key words:** root-knot nematode, growth biostimulant, botanical extracts, capitaneja.

Plants are an important source of bioactive compounds against agricultural pests. Particularly plants with a nematicide activity and their by-products have the potential of being used on the field and of covering part of the demand for chemical nematicides. Chemical compounds have been isolated from various plant families, particularly Asteraceae, *in vitro* ( $\alpha$ -Terthienyl) (Chitwood, 2002; Oka, 2010, 2012). However, these compounds have not yet proven to be effective on the field and have not been commercially developed (Gommers and Bakker, 1988). *Inula viscosa*, a common Asteraceae in Mediterranean countries, has proven to have nematocidal activity, due to the production in its sprouts of cosic and isocosic acids, which were isolated and applied against *Meloidogyne javanica* (Oka, 2001). The extracts of the *Verbesina encelioides* leaves and flowers were also evaluated against the nematode *M. javanica*, with favorable results (Oka, 2012). In addition to the Asteraceae, essential oils and the monoterpene components of other herbaceous plants such as *Ocimum sanctum*, *Xylopiya aethiopica*, *Thymus vulgaris* and others have displayed nematocidal effects (Eloh *et al.*, 2019).

*Meloidogyne incognita* is one of the most harmful nematodes in agriculture worldwide, with damages in diverse annual and perennial crops. The feeding and development of the females cause

que fueron aislados y aplicados contra *Meloidogyne javanica* (Oka, 2001). Los extractos de las hojas y flores de la *Verbesina encelioides* también se evaluaron contra el nematodo *M. javanica*, con resultados favorables (Oka, 2012). Además de las Asteraceae, los aceites esenciales y sus constituyentes monoterpenos de otras plantas herbáceas como *Ocimum sanctum*, *Xylopiya aethiopicum*, *Thymus vulgaris*, entre otras, han demostrado tener efectos nematocidas (Eloh *et al.*, 2019).

*Meloidogyne incognita* es uno de los nematodos más dañinos en la agricultura mundial, con afectaciones en una diversidad de cultivos anuales y perennes. La alimentación y desarrollo de las hembras provocan engrosamientos de las raíces y genera importantes lesiones al expulsar la masa de huevos hacia el suelo. Cuando se tiene alta densidad de población, el daño a las raíces es mayor que provoca pérdida de rendimiento y calidad de la producción (Aissani *et al.*, 2013; Pavaraj *et al.*, 2012). La estrategia de control más utilizada para el manejo del nematodo es el uso de plaguicidas sintéticos. Sin embargo, dichos plaguicidas incrementan los costos de producción y afectan la dinámica del suelo por el uso de moléculas de los grupos de los organofosforados, carbamatos y algunos productos fumigantes de alta residualidad, causando fuerte problemas de contaminación ambiental (Murcia y Stashenko, 2008; Álvarez *et al.*, 2015).

Ante esta problemática es importante evaluar alternativas de menor impacto como el uso de estrategias biorracionales, como el uso de *Verbesina sphaerocephala*. Esta Asteraceae es endémica del occidente de México (Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guanajuato, Guerrero) (Rzedowski *et al.*, 2011) y se conoce con los nombres comunes de capitaneja, capitana, árnica capitaneja, vara blanca o palo espino, es una especie de uso no tan extendido y, solo se cuenta con información taxonómica y etnobotánica, esta última realizada en la comunidad de

root thickening and produce important lesions when releasing their eggs onto the soil. When the population density is high, damages to the roots are such that it can cause a loss in yield and quality of the production (Aissani *et al.*, 2013; Pavaraj *et al.*, 2012). The most widely used control strategy for nematodes is synthetic pesticides. However, these pesticides increase production costs and affect the dynamics of the soil due to the molecules from the group of organophosphates, carbamates and some high-residue products that lead to important environmental pollution problems (Murcia and Stashenko, 2008; Álvarez *et al.*, 2015).

In the light of this problem, it is increasingly important to evaluate alternatives with lower impacts, such as the use of bio-rational strategies like the use of *Verbesina sphaerocephala*. This Asteraceae is endemic to western Mexico (Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guanajuato, Guerrero) (Rzedowski *et al.*, 2011) and it is commonly known as capitaneja, capitana, árnica capitaneja, vara blanca or palo espino. The use of this species is not as extensive and only taxonomic and ethnobotanical information is available, the latter provided by the town of San Martín de las Flores, Jalisco, where the population uses it for its ethnopharmacological properties and agricultural potential (Velasco-Ramírez *et al.*, 2019). It is therefore proposed as a botanical nematocidal control (aqueous extract), since this type of extracts can be produced by the farmers themselves to be used as an alternative to minimize the incidence and damages caused by nematodes in crops of commercial interest, such as cucumbers (*Cucumis sativus*).

The cucumber is the fourth most widely produced crop in the world, with a production of 1.7 million tons in 2016 (Sayedain *et al.*, 2021), and Mexico is the fifth largest producing country in the world, with a production of 826,485 tons. The main cucumber producing states in Mexico are Sinaloa

San Martín de las Flores Jalisco, donde los habitantes la utilizan por su actividad etnofarmacológica y potencial agrícola (Velasco-Ramírez *et al.*, 2019). Por consiguiente, se propone como control nematocida botánico (extracto acuoso); ya que este tipo de extractos pueden ser elaborados por el mismo productor y así utilizarlos como alternativa para minimizar la incidencia y daños ocasionados por nematodos en cultivos de interés comercial, como el pepino (*Cucumis sativus*).

El pepino es la cuarta hortaliza mayormente cultivada en el mundo con una producción de 1,7 millones de toneladas en el 2016 (Sayedain *et al.*, 2021) siendo México el quinto productor mundial con una producción de 826,485 toneladas. Los principales estados productores de esta hortaliza en México son: Sinaloa (268,878 t ha<sup>-1</sup>), Sonora (152,457 t ha<sup>-1</sup>), Michoacán (67,653 t ha<sup>-1</sup>) y el décimo lugar lo ocupa Jalisco (20,454 t ha<sup>-1</sup>) (SIAP, 2020). A pesar de su importancia, el cultivo presenta mermas considerables en los rendimientos, debido a plagas y enfermedades. Por ejemplo, las enfermedades han sido *Fusarium* spp, *Rhizoctonia* spp, Damping off (*Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.), Mancha angul (*Pseudomonas syringae*) y el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) (Satyendra y Rekha, 2021). Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue probar si extractos acuosos obtenidos de las hojas de *V. sphaerocephala* promueven el desarrollo y reducen los daños causados por *M. incognita* en plantas del pepino (*Cucumis sativus*).

Se recolectaron hojas jóvenes (fase vegetativa) sanas (asintomáticas) de la especie silvestre *Verbesina sphaerocephala* en los cerros aledaños de la comunidad de San Martín de las Flores en el municipio de San Pedro Tlaquepaque, Jalisco (longitud: -103.282778 latitud: 20.585278 a 1540 msnm). Las hojas se secaron a temperatura ambiente en el laboratorio (~26 °C), se pulverizaron en un molino de cuchillas (Hamilton Beach® 80335) y

(268,878 t ha<sup>-1</sup>), Sonora (152,457 t ha<sup>-1</sup>), Michoacán (67,653 t ha<sup>-1</sup>) and Jalisco is the tenth state (20,454 t ha<sup>-1</sup>) (SIAP, 2020). Despite its importance, the yields of this crop have considerable reductions due to pests and diseases. For example, diseases have included *Fusarium* spp, *Rhizoctonia* spp, Damping off (*Phytophthora* spp. and *Pythium* spp.), angular leaf spot (*Pseudomonas syringae*) and the root-knotting nematode (*Meloidogyne* spp.) (Satyendra and Rekha, 2021). Due to the above, the aim of this investigation was to test whether aqueous extracts taken from the leaves of *V. sphaerocephala* promote the development and reduce damages caused by *M. incognita* in cucumber plants (*Cucumis sativus*).

Several healthy (asymptomatic) young leaves (vegetative phase) of the wild species *Verbesina sphaerocephala* were gathered from the hills surrounding San Martín de las Flores in the municipal area of San Pedro Tlaquepaque, Jalisco (longitude: -103.282778 latitude: 20.585278 at 1540 masl). The leaves were dried at room temperature in the laboratory (~26 °C), pulverized using a blade mill (Hamilton Beach® 80335) and placed under a proximal chemistry test and a phytochemical analysis to determine the main biomolecules contained in the leaves. Next, 100 g of dry weight were placed in 1 L of distilled water, stirring constantly for 15 min, followed by an autoclave at 121 °C for 1 h at 1.2 kg cm<sup>2</sup>. The hot extracts were poured through Whatman No. 40 filter paper and stored in glass jars at 4 °C. The liquid *V. sphaerocephala* extracts were designated as a stock solution; the pH and electric conductivity (CE, dS m<sup>-1</sup>) were then measured. Finally, the color of the extracts was determined visually. All parameters were evaluated in triplicate.

A *Meloidogyne incognita* population, previously identified with morphometric and pictorial keys (Eisenback *et al.*, 1983) and obtained from the tomato plantation located in the school

fueron sometidas a un análisis de química proximal y análisis fitoquímico para determinar las principales biomoléculas contenidas en las hojas. Posteriormente, 100 g de peso seco se vertió en 1 L de agua destilada con agitación constante durante 15 min, seguido de autoclave a 121 °C por 1 h a 1.2 kg cm<sup>2</sup>. Los extractos calientes fueron pasados a través de papel filtro Whatman No. 40 y almacenados en frascos de vidrio a 4 °C. Los extractos líquidos de *V. sphaerocephala* fueron designados como solución madre, adicionalmente se midió pH y conductividad eléctrica (CE, dS m<sup>-1</sup>). Finalmente, el color de los extractos se determinó visualmente. Todos los parámetros se evaluaron por triplicado.

Una población de *Meloidogyne incognita* previamente identificada a través de claves morfológicas y pictóricas, (Eisenback *et al.*, 1983) y obtenida del cultivo de jitomate ubicado en el invernadero escuela del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, se aisló para su cría y reproducción *in vivo* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en bolsas de polietileno con capacidad de 3 kg (20 x 15 cm) en condiciones de invernadero en el área de Fitopatología del CUCBA.

Para la obtención del inóculo se lavaron las raíces con agua corriente, se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm de longitud, se pesaron 10 g y se colocaron en una batidora. Posteriormente, se agregaron 20 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.5% y 180 mL de agua destilada batiéndose durante 3 min. A continuación, se filtró por un tamiz de 25 µm, donde quedaron retenidos los huevos y se almacenaron en un vaso de precipitado; la suspensión de huevos se aforó a 200 mL. Del vaso de precipitados se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión de huevos y con ayuda de las cuadrículas de una caja contadora de disección se realizó el conteo en el microscopio compuesto (Hussey y Barker, 1973). A los 20 días después de la siembra,

greenhouse of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) of the Universidad de Guadalajara, was isolated for its growth and reproduction *in vivo* on tomato plants (*Solanum lycopersicum*) in 3 kg (20 x 15 cm) polyethylene bags, under greenhouse conditions in the Phytopathology area of the CUCBA.

To obtain the inoculant, the roots were washed using tap water, cut into pieces of approximately 1 cm in length, 10 g were dried and placed in a blender. Next, 20 mL of sodium hypochlorite solution (NaOCl) at 0.5% were added, along with 180 mL of distilled water, mixing for 3 min. It was then filtered through a 25 µm sieve, where the eggs remained and were later stored in a cup containing a precipitate; the suspension with eggs was diluted to 200 mL. A 1 mL aliquot was taken from the egg suspension from the precipitates cup, and with the help of the grid of a dissection counting box, counting began under the compound microscope (Hussey and Barker, 1973). Twenty days after planting, using 24 polyethylene bags, the nematode was inoculated by emptying 105 mL of the egg suspension into every pot, distributed into three orifices, each one 5 cm deep. In this way, 3,030 eggs were inoculated in each pot.

The experiment was carried out in September 2019 in the CUCBA greenhouse using paraíso Enza Zaden cucumber seeds (100 seeds), previously sterilized in a 10% sodium hypochlorite solution for 30 min and then rinsed with distilled water. The seeds were planted in a germination tray with a mixture of peat substrate and vermiculite, 50:50 (sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 min at 1.21 kg cm<sup>2</sup>), and irrigated on a daily basis at field capacity. They were left to grow in the greenhouse for 30 days and transplanted in plastic pots with a homogenized mixture of sand substrate and leaf soil, previously sterilized in an autoclave in a 70:30 proportion. The plants were kept in the greenhouse



en 24 bolsas de polietileno se procedió a la inoculación del nematodo, vaciando 105 mL maceta<sup>-1</sup> de la suspensión de huevos, distribuidos en tres orificios de 5 cm de profundidad. De esta manera se inocularon 3,030 huevos a cada maceta.

El experimento se llevó a cabo en septiembre del 2019 en el invernadero del CUCBA con semillas de pepino paraíso Enza Zaden (100 semillas) previamente esterilizadas en una solución de hipoclorito sodio al 10% durante 30 min y posteriormente enjuagadas con agua destilada, fueron sembradas en una charola de germinación en una mezcla de sustrato de turba y vermiculita 50:50 (esterilizado en autoclave a 121 °C por 20 min a 1.21 kg cm<sup>2</sup>), las cuales se dio riego diario a capacidad de campo. Se dejaron crecer en el invernadero durante 30 días y posteriormente se trasplantaron en macetas de plástico de una mezcla homogeneizada de sustrato de arena y suelo de hojas previamente esterilizado en autoclave en una proporción 70:30. Las plantas se mantuvieron en el invernadero a 27-32 °C bajo condiciones de luz natural con riegos cada dos días y fertilización cada 72 h, utilizando el fertilizante Poly-Feed® (19-19-19) con una dosis de 1g L<sup>-1</sup> hasta concluir el experimento.

Se montaron siete tratamientos diferentes: 1: Testigo, plantas sin nematodos (P), 2: plantas con nematodos (P+N), 3: plantas con nematodos y carbofuran (Furadan®) 350 g L<sup>-1</sup> (P+N+C), 4: plantas con nematodos y *Trichoderma* sp. 200 mL L<sup>-1</sup> (P+N+T), 5: plantas con nematodos y extracto de *V. sphaerocephala* al 25% (P+N+V 25%), 6: plantas con nematodos y extracto de *V. sphaerocephala* al 15% (P+N+V 15%) y 7: plantas con nematodos y extracto de *V. sphaerocephala* al 10% (P+N+V 10%). La aplicación de los extractos fue de 50 mL por maceta. Todos los tratamientos se aplicaron después del segundo día de trasplante y directamente después de la inoculación. El experimento fue organizado en un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones (macetas) y se repitió dos veces.

at 27-32 °C under sunlight, irrigated every 2 days and fertilized every 72 h using the fertilizer Poly-Feed® (19-19-19) with a dose of 1g L<sup>-1</sup> until the end of the experiment.

Seven different treatments were set up: 1: Control, plants without nematodes (P), 2: plants with nematodes (P+N), 3: plants with nematodes and carbofuran (Furadan®) 350 g L<sup>-1</sup> (P+N+C), 4: plants with nematodes and *Trichoderma* sp. 200 mL L<sup>-1</sup> (P+N+T), 5: plants with nematodes and a 25% *V. sphaerocephala* extract (P+N+V 25%), 6: plants with nematodes and 15% *V. sphaerocephala* extract (P+N+V 15%) and 7: plants with nematodes and a 10% *V. sphaerocephala* extract (P+N+V 10%). We applied 50 mL of extract for every pot. All treatments were applied two days after transplanting and directly after inoculation. The experiment was organized in a random block design with five repetitions (pots) and was carried out twice.

Three evaluations were carried out (every 10 days) during the initial growth of the crop until the end of the end of the experiment and the variables considered were plant height (cm, from the apical meristem to the main root), stem diameter (mm), concentration of chlorophyll [SPAD (Soil Plant Analysis Development)- 502], number of leaves and of flowers. By the end of the experiment, 40 days later, plants and roots were removed, washed with drinkable tap water and the root length was recorded (cm), along with the index of root knotting and the number of eggs in 10 g of roots. On the other hand, larvae were extracted and counted out of 20 g of roots, following Bridge and Page (1980) and a record was made of the dry weight of the tissue, which was kept at 60 °C for 48 h in a Felisa® brand drying oven. Finally, the number of larvae in 100 g of soil per treatment were counted, based on Baermann's funnel technique from moist substrate (Barker, 1985).

Se realizaron tres evaluaciones (cada 10 días) durante el crecimiento inicial del cultivo hasta concluir el experimento y se consideraron las variables de altura de la planta (cm, desde el meristemo apical a la raíz principal), diámetro del tallo (mm), concentración de clorofila [SPAD (Soil Plant Analysis Development)- 502], número de hojas y número de flores. Al término del experimento, 40 días después, las plantas junto con la raíz fueron removidas, lavadas con agua potable de grifo y posteriormente se registró longitud de las raíces (cm), índice de agallamiento y número de huevos en 10 g de raíz. Por otro lado, se realizó la extracción y conteo de larvas en 20 g de raíz de acuerdo a lo establecido por Bridge y Page (1980) y se registró el peso seco del tejido, el cual se mantuvo a 60 °C durante 48 h en un horno de secado marca felisa®. Finalmente, se contabilizaron número de larvas en 100 g de suelo por tratamiento, basado en la técnica del embudo de Baermann a partir de sustrato húmedo (Barker, 1985).

Los datos recopilados del experimento se analizaron mediante ANOVA de una vía para cada variable por tratamiento y tiempos de evaluación y una prueba de comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ) utilizando el software estadístico Statgraphics® Centurion XV (New Jersey, United States) para Windows.

Las evaluaciones de química proximal de *V. sphaerocephala* mostraron 17.7% de proteínas, 10.4% de fibra cruda, 15.2% de cenizas totales, 4.6% de extracto etéreo, 2.9% de Nitrógeno, 45.2% de Carbohidratos y 6.8% de humedad; lo cual contiene una gran cantidad de carbohidratos, que explica la alta capacidad de absorción de agua. El análisis fitoquímico (Cuadro 1) arrojó resultados donde demuestran la presencia de metabolitos secundarios fenólicos y alcaloides en extractos acuosos obtenidos de las hojas, que muchos de ellos pueden estar presentes en la interacción planta patógeno y función

The data gathered from the experiment were analyzed with a one-way ANOVA for each variable per treatment and evaluation times and Tukey's mean comparison test ( $p < 0.05$ ) using the statistical software Statgraphics® Centurion XV (New Jersey, United States) for Windows.

The proximal chemistry evaluations performed on *V. sphaerocephala* displayed 17.7% proteins, 10.4% raw fiber, 15.2% total ashes, 4.6% ethereal extract, 2.9% nitrogen, 45.2% carbohydrates and 6.8% moisture, which contains a large amount of carbohydrates, thus explaining the high capacity to absorb water. The phytochemical analysis (Table 1) gave results that show the presence of phenolic and alkaloid secondary metabolites in aqueous extracts obtained from leaves, most of which may be present in the plant-pathogen interaction and the defensive function against parasites or insects due to their toxicity, respectively. The pH values for the *V. sphaerocephala* extracts were alkaline (8.33), the CE was 1 and 1.3 dS m<sup>-1</sup> and the color was dark green.

The effect of the *V. sphaerocephala* extracts on the development of *C. sativus* plants for the variable of height was significantly ( $P = 0.0103$ ) higher in treatment P+N during the first evaluation with an average of 24.6 cm; in the second evaluation, the treatment of P+N+V10% obtained a higher growth, with 26 cm, and in the third evaluation, the treatment of P+N+V25% obtained an average of 27.2 cm (Figure 1A). The stem diameter was significantly ( $P = 0.0514$ ) greater in treatments P+N+T and P+N+V15% during the first evaluation with averages of 0.48 y 0.50 mm respectively. In the second evaluation, the diameter of the stems of the plants in treatment P+N+V25% was significantly ( $P = 0.06521$ ) greater, with an average of 0.50 mm. At the end of the experiment, the diameter of the stems of the plants in treatments P+N+V10% and P+N+V15% was significantly ( $P = 0.09524$ ) greater,

**Cuadro 1. Análisis fitoquímico cualitativo de *Verbesina sphaerocephala*.  
Table 1. Qualitative phytochemical analysis of *Verbesina sphaerocephala*.**

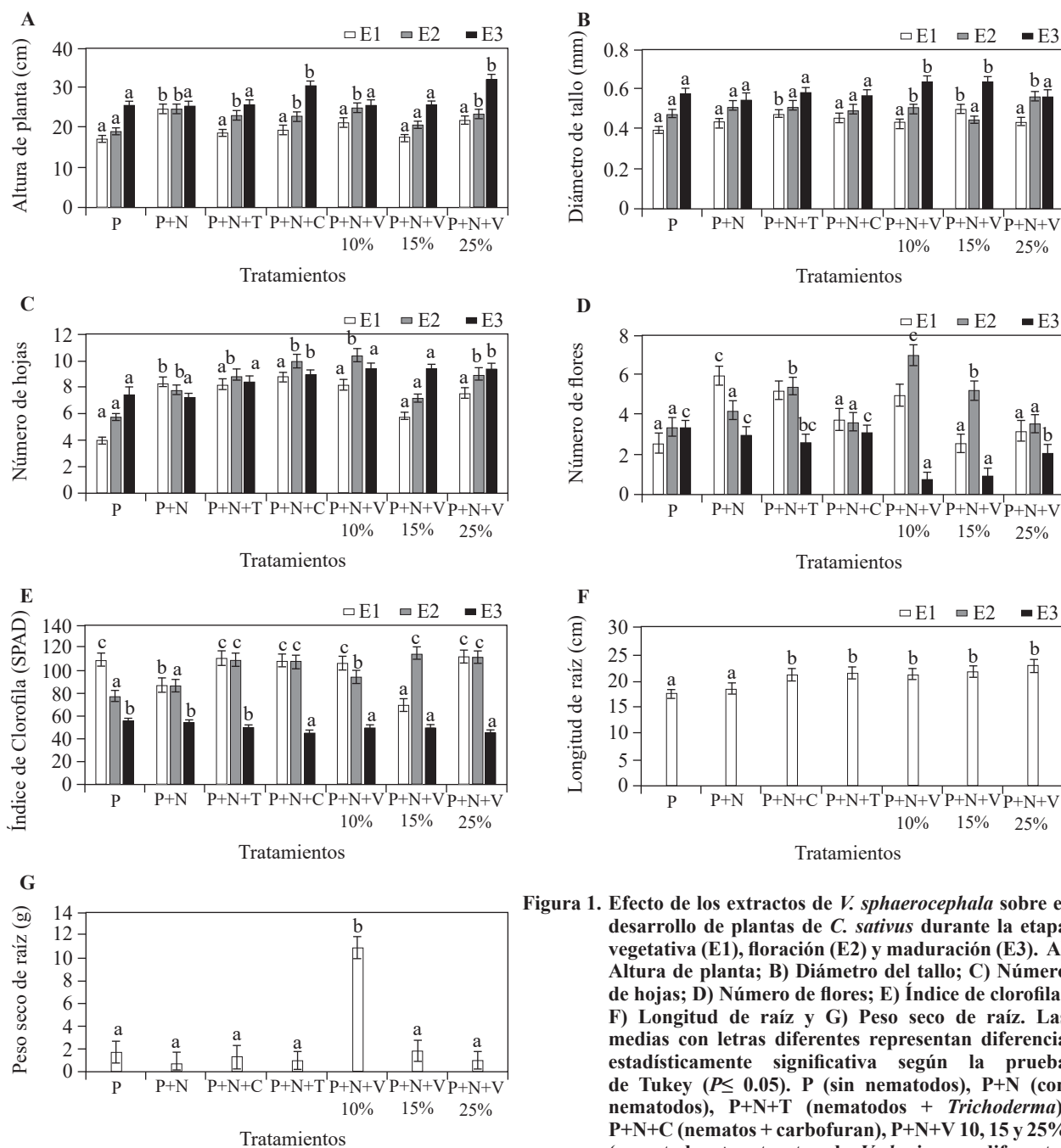
| Constituyentes<br>fitoquímicos | Prueba<br>realizada               | Tipo de<br>extracción |       |      |                     |       |      |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------|------|---------------------|-------|------|
|                                |                                   | Extracto acuoso       |       |      | Extracto metanólico |       |      |
|                                |                                   | Hoja                  | Tallo | Flor | Hoja                | Tallo | Flor |
| Saponinas                      | Ensayo de poder tensoactivo       | -                     | -     | -    | -                   | -     | -    |
| Fenoles                        | Reacción con cloruro férrico      | ++                    | +     | +    | ++                  | +     | +    |
|                                | Reacción con dicromato de potasio | ++                    | +     | +    | ++                  | +     | +    |
| Flavonoides                    | Reacción con NaOH 20%.            | -                     | -     | +    | -                   | -     | -    |
|                                | Shinoda                           | -                     | -     | +    | -                   | -     | -    |
| Alcaloides                     | Dragendorff's:                    | ++                    | -     | ++   | -                   | -     | -    |
|                                | Mayer's                           | ++                    | -     | ++   | -                   | -     | -    |
|                                | Wagner's                          | ++                    | -     | ++   | -                   | -     | -    |
|                                | Hager's:                          | ++                    | -     | ++   | -                   | -     | -    |

Los valores se expresan como positivo (+), resultados muy claros (++), negativo (-); no aplicable (NA). ♦ Values are expressed as positive (+), very clear results (++), negative (-); not applicable (NA)

defensiva frente a parásitos o insectos por su toxicidad, respectivamente. Los valores de pH para los extractos de *V. sphaerocephala* fueron alcalinos (8.33) y la CE fue de 1 a 1.3 dS m<sup>-1</sup> y el color fue verde intenso.

El efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre el desarrollo de plantas de *C. sativus* para la variable altura de planta fue significativamente (P= 0.0103) mayor en el tratamiento P+N durante la primera evaluación con un promedio de 24.6 cm, en la segunda evaluación el tratamiento de P+N+V10% obtuvo un mayor crecimiento con 26 cm y en la tercera evaluación el tratamiento de P+N+V25% obtuvo un promedio de 27.2 cm (Figura 1A). El diámetro del tallo fue significativamente (P= 0.0514) mayor en los tratamientos P+N+T y P+N+V15% durante la primera evaluación con promedios de 0.48 y 0.50 mm respectivamente. En la segunda evaluación, el diámetro del tallo de las plantas del tratamiento P+N+V25% fue significativamente (P= 0.06521) mayor con un promedio de 0.50 mm. Al final del experimento el diámetro del tallo de las plantas de los tratamientos P+N+V10% y P+N+V15% fue significativamente (P= 0.09524)

with values of 0.56 and 0.51 mm respectively (Figure 1B). Regarding the number of leaves, in the first evaluation, treatments P+N, P+N+T and P+N+C were greater (P= 0.0605), with an average of eight leaves, in the second evaluation, treatment P+N+V10% obtained the highest (P= 0.0001) number of leaves (12), and in the third evaluation, all plants treated with *V. sphaerocephala* displayed a higher (P= 0.0009) average number of leaves (10) in comparison with the other treatments (Figure 1C). The number of flowers was higher (P= 0.0517) in treatment P+N with six flowers per plant on average in the first evaluation. In the second evaluation, the highest number of flowers was found in treatment P+N+V10% (P= 0.0001), with an average of nine flowers. In the third evaluation, the highest number of flowers was found in treatments P, P+N and P+N+C, since all plants treated with *V. sphaerocephala* were already in the stage of fruition (Figure 1D). The index of chlorophyll recorded in the first evaluation was similar in all treatments (P= 0.0565). In the second evaluation, treatments P+N+T, P+N+C, P+N+V15% and P+N+V25% displayed a higher chlorophyll index than the rest



**Figura 1.** Efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre el desarrollo de plantas de *C. sativus* durante la etapa vegetativa (E1), floración (E2) y maduración (E3). A) Altura de planta; B) Diámetro del tallo; C) Número de hojas; D) Número de flores; E) Índice de clorofila; F) Longitud de raíz y G) Peso seco de raíz. Las medias con letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). P (sin nematodos), P+N (con nematodos), P+N+T (nematodos + *Trichoderma*), P+N+C (nematodos + carbofuran), P+N+V 10, 15 y 25% (nematodos + extractos de *Verbescina* en diferentes concentraciones).

**Figure 1.** Effect of the extracts of *V. sphaerocephala* on *C. sativus* plant development during the vegetative state (E1), flowering (E2) and maturation (E3). A) Plant height; B) Stem diameter; C) Number of leaves; D) Number of flowers; E) Chlorophyll index; F) Root length, and G) Dry weight of root. Means with different letters represent statistical differences according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). P (without nematodes), P+N (with nematodes), P+N+T (nematodes + *Trichoderma*), P+N+C (nematodes + carbofuran), P+N+V at 10, 15 and 25% (nematodes + *Verbescina* extracts in different concentrations).

mayor con valores de 0.56 y 0.51 mm respectivamente (Figura 1B). Con lo que respecta al número de hojas, en la primera evaluación los tratamientos P+N, P+N+T y P+N+C fueron mayores ( $P=0.0605$ ) obteniendo ocho hojas promedio, en la segunda evaluación el tratamiento P+N+V10% obtuvo el mayor ( $P=0.0001$ ) número de hojas (12) y en la tercera evaluación todas las plantas tratadas con *V. sphaerocephala* presentaron mayor ( $P=0.0009$ ) número de hojas promedio (10) respecto a las plantas de los demás tratamientos (Figura 1C). El número de flores fue mayor ( $P=0.0517$ ) en el tratamiento P+N con seis flores por planta en promedio en la primera evaluación. En la segunda evaluación el mayor número de flores se observó en el tratamiento P+N+V10% ( $P=0.0001$ ) obteniendo un promedio de nueve flores. En la tercera evaluación la mayor cantidad de flores se registró en los tratamientos P, P+N y P+N+C, debido a que todas las plantas tratadas con *V. sphaerocephala* ya se encontraban en etapa de fructificación (Figura 1D). El índice de clorofila registrado en la primera evaluación fue similar en todos los tratamientos ( $P=0.0565$ ). En la segunda evaluación los tratamientos P+N+T, P+N+C, P+N+V15% y P+N+V25% presentaron un índice de clorofila mayor al resto de los tratamientos. En la tercera evaluación hubo un decremento significativo en todos los tratamientos debido a la carga floral y fructífera en las plantas (Figura 1E).

La longitud de raíces en todos los tratamientos de *V. sphaerocephala* fueron significativos ( $P=0.0968$ ) con un promedio de 25 cm (Figura 1F). El peso seco de raíz fue significativamente ( $P=0.0650$ ) mayor para el tratamiento P+N+V10% con un promedio de 1.7 g (Figura 1G).

El efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre la afectación de *M. incognita* en plantas de *C. sativus*, 50 días después del trasplante, presentaron un índice de agallamiento menor ( $P=0.05124$ )

of the treatments. In the third evaluation, there was a significant decrease in all treatments, due to the number of fruits and flowers in the plants (Figure 1E).

The root length in all *V. sphaerocephala* treatments were significant ( $P=0.0968$ ), with an average of 25 cm (Figure 1F). The dry weight of the roots was significantly ( $P=0.0650$ ) higher for treatment P+N+V10% with an average of 1.7 g (Figure 1G).

The effect of the *V. sphaerocephala* extracts on the damage of *M. incognita* on *C. sativus* plants 50 days after transplanting, presented a lower rate of root-knotting ( $P=0.05124$ ) in comparison with the treatment P+N. The roots of treatments P+N+V10% and P+N+T presented the lowest index of root-knotting (14.3%), followed by the treatments with extracts at 15%, Carbofuran and extracts at 25%. Plants with treatments *V. sphaerocephala* al 10% (P+N+V10%) presented no root-knots or egg masses, and these extracts were found to reduce the reproduction of females and the hatching of eggs (Figure 2A). Significant differences ( $P=0.0001$ ) were found for the number of eggs in 10 g of roots in treatment P+N and the lowest values were found in treatments P+N+V10%, P+N+V15% and *Trichoderma*, which caused reductions of 20, 23.6 and 24.8% in the number of eggs in comparison with the control treatment (Figure 2B).

Regarding the number of larvae in the substrate, the treatments with carbofuran and with *V. sphaerocephala* extracts at 15% presented the lowest number, with 100 and 200 larvae, respectively. The larva population density in these treatments was significantly lower than the larva population densities presented in the control treatment. On the contrary, the treatment with *Trichoderma* displayed the highest number of larvae (380) for every 100 g of substrate. The *V. sphaerocephala* extracts did not entirely stop larvae from developing, probably

respecto al tratamiento P+N. Las raíces de los tratamientos P+N+V10% y P+N+T presentaron el menor índice de agallamiento (14.3%); seguidas de los tratamientos con extractos al 15%, Carbofuran y extractos al 25%. Se observó que las plantas con el tratamiento *V. sphaerocephala* al 10% (P+N+V10%) no se encontraron agallas ni masas de huevos, observando que dichos extractos disminuyeron la reproducción de las hembras y eclosión de los huevos (Figura 2A). El número de huevos en 10 g de raíz se observaron diferencias significativas ( $P=0.0001$ ) en el tratamiento P+N, los valores más bajos se encontraron en los tratamientos P+N+V10%, P+N+V15% y *Trichoderma*, los

since these products only paralyze the nematodes instead of causing their death (Figure 2C).

Studies have pointed out the presence of terpenoid and flavonoid compounds and of free aromatic acids (Bohlmann *et al.*, 1980) in species such as *V. virgata* (Martínez *et al.*, 1983), *V. sordescens* (Bohlmann *et al.*, 1982), *V. glabrata* and *V. luetzelgurgii* (Bohlmann *et al.*, 1980). This investigation presents the first phytochemical study of *V. sphaerocephala* (Table 1), in which the presence of phenols (phenolic and/or polyphenols, mainly) that function as antioxidants and may have preventive properties for some diseases and are involved as regulators in defensive processes of

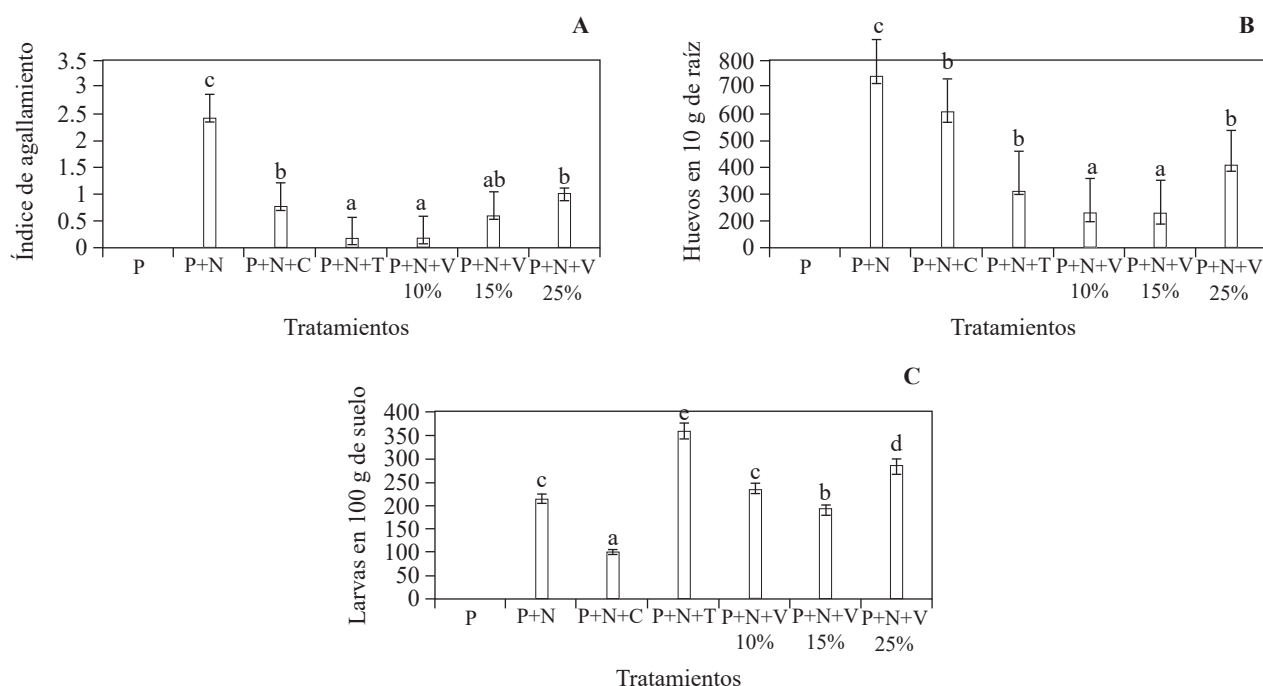


Figura 2. Efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre la afectación causada por *M. incognita* en plantas de *C. sativus*. A. Índice de agallamiento. B. Huevos en 10 g de raíz. C. Larvas en 100 g de suelo. Las medias con letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). P (sin nematodos), P+N (con nematodos), P+N+T (nematodos + *Trichoderma*), P+N+C (nematodos + carbofuran), P+N+V al 10, 15 y 25% (nematodos + extractos de *Verbesina* en diferentes concentraciones).

Figure 2. Effect of the *V. sphaerocephala* extracts on the damage caused by *M. incognita* on *C. sativus* plants. A. Root-knotting index. B. Eggs in 10 g of roots. C. Larvae in 100 g of soil. Means with different letters represent statistical differences according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). P (without nematodes), P+N (with nematodes), P+N+T (nematodes + *Trichoderma*), P+N+C (nematodes + carbofuran), P+N+V at 10, 15 y 25% (nematodes + *Verbesina* extracts in different concentrations).

cuales provocaron una reducción en un 20, 23.6 y 24.8%, en el número de huevos en comparación al tratamiento control (Figura 2B).

Respecto al número de larvas en el sustrato, los tratamientos con aplicación de carbofuran y con extractos de *V. sphaerocephala* al 15% presentaron el menor número 100 y 200 larvas respectivamente. La densidad de población de larvas en estos tratamientos fue significativamente menor a las densidades de población de larvas presentada en el tratamiento control. Por el contrario, en el tratamiento con aplicación de *Trichoderma* se registró el mayor número de larvas (380 larvas) por 100 g de sustrato. Los extractos de *V. sphaerocephala* no impidieron por completo el desarrollo de las larvas; probablemente porque estos productos solo paralizan los nematodos sin provocarles la muerte (Figura 2C).

Estudios han indicado la presencia de compuestos terpenoide, flavonoide y ácidos aromáticos libres (Bohlmann *et al.*, 1980) en especies como *V. virgata* (Martínez *et al.*, 1983), *V. sordescens* (Bohlmann *et al.*, 1982), *V. glabrata* y *V. luetzelgurgii* (Bohlmann *et al.*, 1980). En esta investigación se presenta el primer estudio fitoquímico de *V. sphaerocephala* (Cuadro 1) donde fue evidente la presencia de fenoles (ácidos fenólicos y/o polifenoles principalmente) que funcionan como antioxidantes y pueden tener propiedades preventivas de algunas enfermedades e implicados como reguladores en procesos defensivos en las plantas e incluso con efectos alelopáticos (Willians *et al.*, 2004); también fue clara la presencia de alcaloides cuyas propiedades han sido documentadas como sustancias protectoras de las plantas contra el ataque de bacterias, virus, hongos y herbívoros (Bruneton, 2001). Con base a estos resultados, se pretende investigar en un futuro las actividades antioxidantes e inhibitoria de radicales, así como el tipo de alcaloides que contiene *V. sphaerocephala* para determinar su modo de acción.

plants, and even have allelopathic effects (Willians *et al.*, 2004), became evident. Also clear was the presence of alkaloids, which have properties that have been documented as protective of plants against the attack of bacteria, viruses, fungi and herbivores (Bruneton, 2001). Based on these results, there is an intention for future investigations of the antioxidant and inhibiting activities of radicals, as well as the type of alkaloids found in *V. sphaerocephala* to determine the way in which they react.

During the evaluations throughout the experiment, the 10 and 25% *V. sphaerocephala* extracts in all variables showed that they stimulate plant development, even in pots and in the presence of *M. incognita*, as mentioned by Mora *et al.* (2013), who point out that several *Verbesina* species contain active organic compounds as growth regulators.

According to the results obtained in each of the cucumber growth variables in pots, the 10% *Verbesina* extracts were efficient for plant height, number of leaves, flowers, chlorophyll index and dry weight of roots, as indicated by Oka (2012) in an investigation carried out on *V. encelioides* aqueous extracts, in which the nematocidal activity of *M. javanica* and the effect on the growth of *Inula viscosa*. The investigation coincides with the results of this investigation, in which *Verbesina* was found to be an efficient bio-stimulant, since it acted on the physiology of cucumber plants in different ways, and vigor and crop yield were not affected by the infestation of *M. incognita*.

Regarding the damage of *M. incognita* on cucumber plants, *Trichoderma* improves the resistance of the roots to the. Because it is considered an inoculant that promotes the growth and provides benefits and protection to the plants, it may have stimulated root development, helping reduce damage caused by nematodes (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Baños *et al.* (2010) recommend the

Durante las evaluaciones a lo largo del experimento, los extractos de *V. sphaerocephala* al 10 y 25% en todas las variables demostraron que estimulan el desarrollo de la planta aun en condiciones de maceta y con la presencia de *M. incognita* tal como lo mencionan Mora *et al.* (2013), donde hacen referencia que varias especies de *Verbesina* tienen compuestos orgánicos activos como reguladores de crecimiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cada una de las variables de crecimiento de pepino en maceta, los extractos de *Verbesina* al 10% fueron eficientes para altura de planta, número de hojas, flores, índice de clorofila y peso seco en raíz, como señala Oka (2012) en una investigación hecha con extractos acuosos de *V. encelioides* donde evaluó la actividad nematocida de *M. javanica* y el efecto en el crecimiento de *Inula viscosa*, la cual coincide con estos resultados donde *Verbesina* es eficaz como bioestimulante, ya que actuó sobre la fisiología de las plantas de pepino de diferentes formas y no se vio afectado el vigor y rendimiento del cultivo ante la infestación por *M. incognita*. Lo que respecta a la afectación de *M. incognita* sobre las plantas de pepino indicaron que *Trichoderma* mejoró la resistencia de las raíces a los síntomas de agallamiento. Es posible que al ser considerado como inoculante que promueve el crecimiento y brinda beneficios y protección a las plantas haya estimulado el desarrollo a las raíces lo que ayuda a disminuir la afectación por nematodos (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Baños *et al.* (2010) recomiendan el uso de *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. en hortalizas, ya que afirman ser un biorregulador efectivo contra nematodos de este género por medio de sus toxinas e hifas. Por otro lado, la aplicación de *Trichoderma* no mostró actividad nematocida, ya que se encontró mayor número de nematodos en el suelo. Es posible que al

use of *Trichoderma* spp. in the management of *Meloidogyne* spp. in vegetables, since they proved to be an effective bioregulator against nematodes of this genus due to its toxins and hyphae. On the other hand, applying *Trichoderma* showed no nematocidal activity, since a greater number of nematodes were found on the soil. Stimulating the development of roots may have allowed a greater number of females to establish their feeding site, leading to a higher reproduction rate. It must be pointed out that the cucumber crop is susceptible to the attack of the *M. incognita* nematode, as expressed by Julca *et al.* (2001). Similar results were reported by Oka (2012) who, using *V. encelioides*, evaluated aqueous leaf extracts against *M. javanica*. Vázquez-Sánchez *et al.* (2018) determined the effectiveness of aqueous extracts of *V. sphaerocephala* leaves against *Nacobus* immobilizing the nematode, hindering their ability to feed and invade host leaves. Extracts of garlic (*Allium sativum*), marigold (*Tagetes erecta*), papaya (*Carica papaya*) and Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) have also been used to determine the nematocidal effects on *Meloidogyne* spp. in bean plants (*Phaseolus vulgaris*) (Parada and Guzmán, 1997). The use of *Tagetes zypaquirensis* essential oils has also been useful in the management of the nematode *Meloidogyne* spp. as published by Álvarez *et al.* (2015) and recommended by Elohe *et al.* (2019) in an evaluation carried out with the selection of 10 plants grown in West Africa against *M. incognita*.

This investigation determined that the use of aqueous extracts of *V. sphaerocephala* at 10 and 15% may have the biological potential to minimize damages on roots caused by *M. incognita*. It is therefore necessary to carry out more rigorous studies to determine the effect of the extracts on the reproduction rate of *M. incognita*.



estimular el desarrollo de las raíces haya permitido que mayor número de hembras establecieran su sitio de alimentación, con la consiguiente mayor tasa de multiplicación. Hay que destacar, que el cultivo de pepino es susceptible al ataque del nematodo *M. incognita* como lo manifiesta Julca *et al.* (2001).

Resultados similares fueron reportados por Oka (2012), utilizando *V. encelioides*, quien evaluó extractos acuosos de hojas para combatir el nematodo *M. javanica*. Vázquez-Sánchez *et al.* (2018) determinó la efectividad de extractos acuosos de hojas de *V. sphaerocephala* contra *Nacobus* inmovilizando al nematodo, los cuales bloquearon la alimentación y capacidad para invadir las raíces de la planta huésped. Extractos de ajo (*Allium sativum*), cempasúchil (*Tagetes erecta*), papayo (*Carica papaya*) y barrenillo (*Cynodon dactylon*) también han sido utilizados para determinar los efectos nematocidas sobre *Meloidogyne* spp. en frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Parada y Guzmán, 1997). La aplicación de aceites esenciales de *Tagetes zypaquirensis* también ha sido útil para el manejo del nematodo *Meloidogyne* spp. como lo da a conocer Álvarez *et al.* (2015) y lo recomienda Eloh *et al.* (2019) en una evaluación hecha con la selección de 10 plantas cultivadas en África occidental para combatir *M. incognita*.

En esta investigación se determinó que el uso de extractos acuosos de *V. sphaerocephala* al 10 y 15% puede tener un potencial biológico para minimizar la afectación de las raíces causada por *M. incognita*. Por lo cual, es necesario realizar estudios más rigurosos para determinar el efecto de los extractos sobre la tasa de multiplicación de *M. incognita*.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Sandra Fabiola Velasco-Ramírez por sus aportaciones técnicas e interpretación en los análisis fitoquímicos de *V. sphaerocephala*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Dr. Sandra Fabiola Velasco-Ramírez for her technical contributions and interpretation in the phytochemical analyses of *V. sphaerocephala*.

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

LITERATURA CITADA

- Aissani N, Tedeschi P, Maietti A, Brandolini V, Garau VL, and Caboni P. 2013. Nematicidal Activity of Allylthiocyanate from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots against *Meloidogyne incognita*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61(20): 4723-4727. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4008949>
- Álvarez DE, Botina JA, Ortiz AJ y Botina LL. 2015. Evaluación nematocida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* en el manejo del nematodo *Meloidogyne* spp. Revista de Ciencias Agrícolas 33(1): 22-33. <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.163301.3>
- Baños YS, Concepción AB, Lazo RC, González IA y Morejón LP. 2010. Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. Revista Brasileira de Agroecología 5(2): 224-233. https://orgprints.org/id/eprint/24512/1/Ba%C3%B1os_Efecto.pdf
- Barker KR. 1985. Nematode extraction and bioassays. In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN (eds) An advanced treatise on Meloidogyne, vol 2. Methodology. North Carolina University Graphics, Raleigh, 19-35p.
- Bohlmann F, Genz M, Gupta K, Dhar K, Ahmed M, King M and Robinson H. 1980. Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. Phytochemistry 19(11): 2391-2397. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91034-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91034-3)
- Bohlmann F, Zdero C, Robinson H and King MR. 1982. Two new eudesmane cinnamates from *Verbesina sordescens*. Phytochemistry 21(7): 1663- 1664. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85036-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85036-X)
- Bridge J and Page SLJ. 1980. Estimation of Root-knot Nematode Infestation Levels on Roots Using a Rating Chart. Tropical Pest Management 26(3): 296-298. <http://dx.doi.org/10.1080/09670878009414416>
- Bruneton J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales. Segunda Edición. Editorial Acribia. 1100p.
- Chitwood DJ. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review Phytopathology 40(1): 221-249. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045>
- Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN Y Triantaphyllou AC. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) con una clave pictórica. International Meloidogyne Project, North Carolina 55p.

- Eloh K, Kpegba K, Sasanelli N, Koumaglo HK and Caboni P. 2019. Nematicidal activity of some essential plant oils from tropical West Africa. *International Journal of Pest Management* 1-11. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1576950>
- Gommers FJ and Bakker J. 1988 Physiological diseases induced by plant responses or products. *In: Poinar GO, Jansson H-B (eds) Diseases of nematodes, vol 1. CRC Press, Boca Raton, 3–22p*
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R y Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science* 35(1): 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hussey RS and Barker KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025–1028
- Julca A, Gallego E, Sánchez J y Cordovilla P. 2001. Agua y nematodos parásitos de las plantas. *Revista Horticultura* 154: 1-7. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_2001_154_20_26.pdf
- Martínez AM, De Vivar RA, Ortega A, Quintero ML, García C and Fronczek RF. 1983. Eudesmane triols from *Verbesina virgata*. *Phytochemistry* 22(4): 979-982. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)85035-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)85035-3)
- Mora FDL, Alpan VJ, McCracken and Nieto M. 2013. Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. *The Natural Products Journal* 3(2):140-150.
- Murcia OAM y Stashenko E. 2008. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro Sur*. 36(2):11. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2008.v36n2-03>
- Oka Y. 2010. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments. *Applied Soil Ecology* 44(2):101–115. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.11.003>
- Oka Y. 2012. Nematicidal activity of *Verbesina encelioides* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and effects on plant growth. *Plant Soil*. 355(1-2): 311-322. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-1100-8>
- Oka Y, Ben-Daniel B and Cohen Y. 2001. Nematicidal activity of powder and extracts of *Inula viscosa*. *Nematology* 3(8):735–742. <https://doi.org/10.1163/156854101753625245>
- Parada RY y Guzmán RF. 1997. Evaluación de extractos botánicos contra el nematodo *Meloidogyne* sp., en frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomía Mesoamericana* 8(1): 108 - 114. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/24745>
- Pavaraj M, Bakavathiappan Ga and Baskaran S. 2012. Evaluation of some plant extracts for their nematicidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Biopesticides* 106-110. http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/Vol_5_0_106_110F.pdf
- Rzedowski J, Calderón de Rzedowski G y Carrillo-Reyes P. 2011. Compositae. Tribu Heliantheae II (géneros Lagascea-Zinnia). *Flora del Bajío y de Regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, México.*
- Satyendra S and Rekha B. 2021. Bio-management of soil borne pathogens infesting cucumber (*Cucumis sativus* L.) under protected cultivation system. *Biological Control* 157: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104569>
- Sayedain FS, Ahmadzadeh M, Fattah S and Bode H. 2021. Soil application of entomopathogenic nematodes suppresses the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Journal of Plant Diseases and Protection* 1-9. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00367-1>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Atlas-Agroalimentario. inforural.com.mx. (Consulta abril 2021).
- Vázquez-Sánchez M, Medina-Medrano JR, Cortez-Madrigal H, Angoa-Pérez MV, Muñoz-Ruiz CV, and Villar-Luna E. 2018. Nematicidal activity of wild plant extracts against second-stage juveniles of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 48(2): 136-144. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/107822>
- Velasco-Ramírez AP, Velasco-Ramírez SF y Velasco-Ramírez A. 2019. Uso en medicina tradicional de *Verbesina sphaerocephala* A. Gray (Asteraceae) en la comunidad de San Martín de las Flores, Jalisco, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 18(2): 144-154. https://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo_4_-_1566_-_144_-_154.pdf
- Williams CA and Graver RJ. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports* 21(4): 539-573. <https://doi.org/10.1039/B311404J>

Housekeeping genes selection for gene expression on *Citrus sinensis* infected with CLAs or CTV using RT-qPCR

Selección de genes de referencia en expresión génica de *Citrus sinensis* infectados con CLAs o CTV mediante RT-qPCR

Rosa Isela Triana-Gutiérrez, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa*, ¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura; Gustavo Mora-Aguilera, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología; Raquel Cano-Medrano¹, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5. Carretera México- Texcoco. Texcoco de Mora, Estado de México. CP. 56230; José Joaquín Velázquez-Monreal, INIFAP- CE Tecmán. Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecmán, Colima, México. *Autor para correspondencia: alexge@colpos.mx

Recibido: 27 de Febrero, 2021.

Aceptado: 18 de Abril, 2021.

Triana-Gutiérrez RI, Gutiérrez-Espinosa MA, Mora-Aguilera G, Cano-Medrano R and Velázquez-Monreal JJ. 2021. Housekeeping genes selection for gene expression on *Citrus sinensis* infected with CLAs or CTV using RT-qPCR. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 354-370.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2102-2>

Primera publicación DOI: 30 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 30, 2021.

Resumen. Una posible alternativa para el control de CTV y CLAs en *Citrus sinensis* es el empleo de resistencia genética adquirida. El estudio de este mecanismo, requiere normalizar con genes de referencia. Por lo tanto, se desarrolló un protocolo de cuantificación de expresión génica mediante RT-qPCR para evaluar el uso potencial de *GAPDH*, *ACTINA*, *F-BOX*, *COX* y *18S rRNA* como genes de referencia en cítricos. Un total de nueve plantas infectadas con CTV (3), CLAs (3) y sanas (3) se emplearon para seleccionar una muestra compuesta

Abstract. A possible alternative for the control of CTV and CLAs in *Citrus sinensis* is the use of systemic acquired resistance. The study of this mechanism requires normalizing with reference genes. Therefore, a gene expression quantification protocol using RT-qPCR was developed to evaluate the potential use of *GAPDH*, *ACTIN*, *F-BOX*, *COX*, and *18S rRNA* as *reference genes* in citrus. A total of nine plants infected with CTV (3), CLAs (3), and healthy (3) were used to select a composed sample of eight leaves/plant. An in-house protocol was developed and optimized in all its stages, varying the concentration of reagents, primers, and reaction template. Extraction of total RNA with 2% CTAB was in the range of 200-1000 ng μL^{-1} . The reverse transcription produced on average 1069 ng μL^{-1} cDNA. The *reference gene* products *GAPDH*, *ACTINA*, and *F-BOX* exhibited melting curves without dimer products, $C_t \leq 28$, and reaction efficiencies in the range of 90-110%. In all gene expressions, CTV infected samples had the higher C_t 's (25-27) followed by healthy samples (24-25).

de ocho hojas/planta. El protocolo no comercial se desarrolló y optimizó en todas sus etapas variando concentración de reactivos, iniciadores y sustrato de reacción. La extracción del ARN total con CTAB al 2% estuvo en el rango de 200-1000 ng μL^{-1} . La retrotranscripción produjo en promedio 1069 ng μL^{-1} ADNc. Los productos de los genes de referencia *GAPDH*, *ACTINA* y *F-BOX* exhibieron curvas de disociación sin expresión de dímeros, $C_t \leq 28$ y eficiencias de reacción en el rango de 90-110%. En todas las expresiones de genes, muestras con CTV tuvieron los C_t 's más tardíos (25-27) seguido de las muestras sanas (24-25). Sin embargo, *GAPDH* y *ACTINA* presentaron la expresión génica más estable ($\ln 1/M = 2.83$) por lo que estos genes se proponen para normalización. El protocolo RT-qPCR fue también específico y eficiente para el gen *CDR13*, putativamente asociado a resistencia sistémica adquirida a CLas, lo que sugiere su viabilidad en estudios de resistencia de *C. sinensis/C. aurantium* en respuesta a la infección de CTV y CLas.

Palabras clave: Transcriptoma, Naranja, *CDR13*, *ACTINA*, *GAPDH*

En 2018, México fue el cuarto productor de naranja (*Citrus sinensis*) en el mundo con 4.7 millones de toneladas, de las cuales el 98% se destinó al consumo interno (SIAP, 2019; Rivera-López *et al.*, 2020). Sin embargo, la producción histórica no exhibe el potencial productivo nacional y representa una citricultura altamente heterogénea determinada por la diversidad tecnológica, régimen hídrico, factores edáficos y problemas fitosanitarios. Diversos programas federales y/o estatales se han implementado para impulsar la productividad e incluso promover la reconversión citrícola. En particular, en las últimas dos décadas se han establecido campañas

However, *GAPDH* and *ACTIN* had the most stable gene expression ($\ln 1/M = 2.83$), therefore these genes are proposed for normalization. The RT-qPCR protocol was also specific and efficient for the *CDR13* gene, putatively associated with systemic acquired resistance to CLas, which suggest its viability in resistance studies of *C. sinensis/C. aurantium* in response to CTV and CLas infection.

Key words: Transcriptome, Orange, *CDR13*, *ACTIN*, *GAPDH*.

In 2018, Mexico was the fourth largest sweet orange (*Citrus sinensis*) producer in the world, with 4.7 million tons, 98% of which was used for domestic consumption (SIAP, 2019; Rivera-López *et al.*, 2020). However, historical production does not show the national productive potential and represents a highly heterogenous citrus production, determined by technological diversity, water regimes, edaphic factors and phytosanitary problems. Several federal and/or state programs have been implemented to boost productivity and even promote the modernizing of the citrus sector. Particularly in the last two decades, national phytosanitary campaigns have been established for the management of the *Citrus tristeza virus* (CTV) and *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). These pathogens have a high epidemic potential, due to the dispersal capacity and agroecological adaptation of their vectors, the systemic infection condition and their genetic variability (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Domínguez-Monge *et al.*, 2014; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). The CTV, and recently CLas, have caused important economic losses in Brazil, Argentina, USA, Venezuela and other countries, and have modified the world's citrus production

fitosanitarias nacionales para el control del *Citrus tristeza virus* (CTV) y *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). Estos patógenos poseen alto potencial epidémico por la capacidad de dispersión y adaptación agroecológica de sus vectores, condición infectiva sistémica y su variabilidad genética (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Domínguez-Monge *et al.*, 2014; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). El CTV y recientemente CLAs, han causado fuertes pérdidas productivas en Brasil, Argentina, EUA, Venezuela y otros países, y han modificado los modelos productivos cítricos mundiales (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Dowson *et al.*, 2015). En México, CLAs, causante de la enfermedad denominada huanglongbing o HLB, es una bacteria restringida al floema transmitida eficientemente por *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). En este país, la expresión de síntomas en *C. sinensis* está influenciada por el portainjerto y la variante de secuencia de la bacteria pudiendo incluso ser asintomática en campo (Martínez-Bustamante *et al.*, 2015). Por el contrario, la expresión de síntomas en cítricos agrios es de mayor intensidad pero también dependiente de la genética del portainjerto y patógeno. Así, en *C. aurantifolia/C. macrophylla* se manifiesta clorosis foliar asimétrica, aborto de semillas y deformación de frutos, típicamente reportadas en naranjos de Brasil y Florida, pero además exhibe amarillamiento generalizado de follaje (Esquivel-Chávez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

CTV, causal de la enfermedad ‘tristeza de los cítricos’, es un closterovirus asociado al floema y transmitido en forma semipersistente por un complejo de áfidos vectores (Hemiptera: Aphididae) entre los que destacan *Aphis gossypii* y *Toxoptera citricida* en México (Dowson *et al.*, 2015; Loeza-Kuk *et al.*, 2011). Contrario al escenario epidémico de los 30’s en Sudamérica, caracterizado por mar-

models (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Dowson *et al.*, 2015). In Mexico, CLAs, which causes the diseased named huanglongbing or HLB, is a bacterium, restricted to the phloem efficiently transmitted by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). In this country, the symptoms expression in *C. sinensis* is influenced by the rootstock and the bacterium sequence variant, and can even be asymptomatic under field condition (Martínez-Bustamante *et al.*, 2015). In contrast, the symptoms expression in sour citrus species is more intense, yet also dependent on the rootstock and pathogen genetics. Thus, *C. aurantifolia/C. macrophylla* displays asymmetric foliar chlorosis, seed abortion and fruit deformities, typically reported in orange trees in Brazil and Florida, but it also presents a generalized yellowing of the foliage (Esquivel-Chávez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

CTV, causal agent of the ‘citrus tristeza’ disease, is a closterovirus related to the phloem and transmitted semi-persistently by a vector aphid complex (Hemiptera: Aphididae), including *Aphis gossypii* and *Toxoptera citricida*, the most important in Mexico (Dowson *et al.*, 2015; Loeza-Kuk *et al.*, 2011). In this country, as opposed to the epidemic scenario of the 1930’s in South America, in which wilting (‘tristeza’) and quick decline and death of about 15 million *C. sinensis/C. aurantium* trees became a notorious characteristic, the predominant condition has been asymptomatic and subendemic since pathogen detection in the 1980’s (G. Mora-Aguilera, 2018. Personal communication; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). Simulation models show that moderate races selection has operated on this virus in detriment of severe races, maintaining a relatively stable population structure with limited genotypic variability (G. Mora-Aguilera, 2018. Personal communication). However, this apparent equilibrium may be temporarily altered with the

chitez (tristeza) y muerte rápida de aproximadamente 15 millones árboles *C. sinensis*/*C. aurantium*, en México la condición predominante ha sido asintomática y subendémica a partir de la detección del patógeno en los 80's (G. Mora-Aguilera, 2018. Comunicación personal; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). Modelos simulativos demuestran que la selección de razas moderadas ha operado en este virus en detrimento de razas severas manteniendo una estructura poblacional relativamente estable con limitada variabilidad genotípica (G. Mora-Aguilera, 2018. Comunicación personal). Sin embargo, este aparente equilibrio puede ser temporalmente alterado con introducción de nuevas razas, desbalances inducidos por factores climáticos y microbiológicos, como es el caso del reciente brote reportado en el centro de Veracruz (Martínez-Bustamante *et al.*, 2020). La dificultad de controlar estos patógenos con estrategias convencionales (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; Loeza-Kuk *et al.*, 2011), y la necesidad de producir materiales genéticos resistentes en menor tiempo posible (CTV) o ante la ausencia de fuentes de resistencia viables para estos patógenos (CLas), propició en los 90's la obtención exitosa de cítricos transgénicos, primero en CTV y posteriormente en CLas (Soares *et al.*, 2020; Loeza-Kuk *et al.*, 2011; Gutiérrez-Espinosa *et al.*, 1997). Sin embargo, regulaciones de bioseguridad ha limitado su implementación comercial. Nuevas tecnologías genómicas han favorecido el estudio de genes endógenos del hospedero, en oposición a un gen exógeno implícito en la tecnología transgénica, explotando la expresión contrastante de síntomas en función de genética del patógeno implicado en la infección y la composición injerto/portainjerto. Este fenómeno natural, conocido como *resistencia sistémica adquirida* puede ser potenciado a través de estudios transcriptómicos mediante análisis de expresión diferencial a nivel de ARNm de genes que responden a un proceso patogénico respecto

introduction of new races and imbalances due to climate and microbiological factors, such as those implied by the recent outbreak reported in central Veracruz (Martínez-Bustamante *et al.*, 2020). The difficulty of controlling these pathogens with conventional strategies (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; Loeza-Kuk *et al.*, 2011), along with the need to produce resistant genetic materials in the least time possible (CTV) or the lack of feasible resistance sources against these pathogens (i.e. CLas) led to successfully obtain transgenic citrus material in the 1990's, first on CTV and later on CLas (Soares *et al.*, 2020; Loeza-Kuk *et al.*, 2011; Gutiérrez-Espinosa *et al.*, 1997). Nevertheless, biosafety regulations have limited their extensive commercial implementation. New genomic technologies have favored the study of endogenous hosts genes, as opposed to an exogenous gene implicit in transgenic technology, exploiting the contrasting expression of symptoms based on the pathogen genetic and the graft/rootstock composition. This natural phenomenon, known as *systemic acquired resistance* may be strengthened through transcriptomic studies by differential expression analyses, at the level of mRNA, of genes that respond to a pathogenic process respect to *reference genes* from the host or 'housekeeping' (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016; Mafra *et al.*, 2013). The latter genes are essential for the plant physiology; therefore, its expression is not dependent, in theory, of the infections process (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2008; He *et al.*, 2006). An earlier investigation cloned three endogenous genes that may eventually provide resistance from pathogens in citrus species, including CLas and CTV, through its sustained expression in high concentrations in the cisgenic plants, providing resistance with its own genes (Ventura-Medina *et al.*, 2019). A crucial stage in this cisgenic approach is the quantification of the

a *genes de referencia* del hospedero o ‘housekeeping’ (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016; Mafra *et al.*, 2013). Estos últimos genes son esenciales para la fisiología de la planta por lo que su expresión no es dependiente, teóricamente, de un proceso infeccioso (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2008; He *et al.*, 2006). En un trabajo previo se logró clonar tres genes endógenos que podrían eventualmente conferir resistencia a patógenos en cítricos, incluyendo a CLas y CTV, a través de su sostenida expresión en altas concentraciones en las plantas cisgénicas induciendo resistencia con sus propios genes (Ventura-Medina *et al.*, 2019). Una etapa fundamental en este enfoque cisgénico es cuantificar la expresión de un gen endógeno potencial en respuesta a la interacción planta-patógeno, lo cual es dependiente de la correcta selección de un *gen de referencia* (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012). En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un protocolo que permitiera evaluar la expresión de cinco *genes de referencia* con base a criterios de eficiencia y estabilidad en el proceso de amplificación por RT-qPCR respecto al gen endógeno *CDR13* transcrito en respuesta a la infección de CLas y CTV en plantas *C. sinensis/C. aurantium* para futuros estudios de *resistencia sistémica adquirida* en las condiciones citrícolas y fitosanitarias mexicanas.

Material vegetal. En mayo 2019 se seleccionaron nueve plantas de *C. sinensis* injertadas en *C. aurantium* provenientes de la colección COLPOS-INIFAP establecida en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Tecmán (INIFAP-CE Tecmán). Este material se mantuvo durante la investigación en condiciones de invernadero en COLPOS Montecillo. El experimento incluyó tres plantas por cada condición sanitaria: a) CTV positivas, b) CLas positivas y c) sanas. La condición enferma

expression of a potentially endogenous gene in response to the plant-pathogen interaction, which depends on the correct selection of a *reference gene* (Yan *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2012). In this context, the aim of this investigation was to develop an in-house protocol to evaluate the expression of five *reference genes* based on efficiency and stability criteria in the amplification process with RT-qPCR regarding the endogenous *CDR13* gene transcribed in response to CLas and CTV infection in *C. sinensis/C. aurantium* for future *systemic acquired resistance* studies under the Mexican citrus production and phytosanitary condition.

Plant material. In May 2019, nine *C. sinensis* plants, grafted onto *C. aurantium*, were chosen from the COLPOS-INIFAP collection established in the Tecoman experimental station of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP-CE Tecmán). This material was kept during the investigation under greenhouse conditions in COLPOS Montecillo. The experiment included three plants for each sanitary condition: a) positive to CTV, b) positive to CLas and c) healthy. The diseased and healthy conditions were confirmed by qPCR in the Fruiticulture laboratory, COLPOS. The diseased plants were inoculated in 2014 with infected citrus tissue from Jalisco and Puebla commercial orchards. The healthy plants were 18-months-old. The plant sample used for the extraction of nucleic acids consisted of eight mature leaves per plant from different orientation and strata.

Extraction, quantity and quality of RNA. For extraction of total RNA, 0.1 g of midrib leaves (*C. sinensis*) were used with the CTAB protocol at 2%. Yield and quality of total nucleic acids were quantified using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). The optic density rate at 260/280

y sana se confirmó por qPCR en el laboratorio de Fruticultura, COLPOS. Las plantas enfermas se inocularon en 2014 con inóculo procedente de Jalisco y Puebla, respectivamente. Las plantas sanas fueron de 18 meses de edad. La muestra vegetal empleada para la extracción de ácidos nucleicos consistió de ocho hojas maduras por planta provenientes de diferente orientación y estrato.

Extracción, cuantificación y calidad de ARN.

Para la extracción de ARN total se empleó 0.1 g de nervadura central de hojas de naranjo (*C. sinensis*) mediante el protocolo de CTAB al 2%. Se cuantificó el rendimiento y calidad de ácidos nucleicos totales empleando el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se verificó que la tasa de densidad óptica a 260/280 y 260/230 nm de longitud de onda se mantuviera en el rango 1.8-2.0 para garantizar ausencia de contaminación por proteínas o fenoles. La extracción de ácidos nucleicos totales permitió obtener concentraciones de 200-1000 ng μL^{-1} a partir de nervadura central foliar de *C. sinensis* (Cuadro 1). En todas las muestras las cantidades

and 260/230 nm wavelengths was evaluated to assured a 1.8-2.0 range to guarantee the absence of proteins or phenols contamination. The extraction of total nucleic acid allowed to obtain concentrations of 200-1000 ng μL^{-1} (Table 1). In all samples, the amounts obtained were enough to homogenize a subsample at 50 ng μL^{-1} . This stage was crucial for the correct comparison of differential expression of the evaluated genes, avoiding over- or underestimating them. The optical density rate (260/280) was in the 1.93 - 2.01 range (Table 1), meaning that the quality and purity of the nucleic acids were within an optimal range. Values below 1.8 indicate the presence of proteins, phenols or other contaminants (Taylor *et al.*, 2015).

Retrotranscription. For the cDNA synthesis, 50 ng μL^{-1} RNA were used after homogenizing with nuclease-free water. Retrotranscription with dT oligos was performed in two stages using an in-house protocol. Five trials were carried out with the purpose of optimizing the cDNA concentration (Table 2). The reaction mixture at the first stage

Cuadro 1. Cantidad y calidad de ARN total extraído a partir de nervadura central de una muestra foliar compuesta por planta de *Citrus sinensis*/C. *aurantium*.
Table 1. Quantity and quality of total RNA extracted from midrib leaves of a composed sample per plant of *Citrus sinensis*/C. *aurantium*.

| Material Vegetal ^x | Conc. Ácido Nucleico (ng μL^{-1}) | Tasa 260/280 | Tasa 260/230 ^z |
|-------------------------------|---|--------------|---------------------------|
| Planta sana/R1 | 976.2 | 2.02 | 1.96 |
| Planta sana/R2 | 779.3 | 1.93 | 1.92 |
| Planta sana/R3 | 628.2 | 1.94 | 1.94 |
| +CLas (Jalisco)/R1 | 1186.7 | 2.01 | 1.97 |
| +CLas (Jalisco)/R2 | 1070.5 | 1.94 | 1.8 |
| +CLas (Jalisco)/R3 | 236.2 | 1.94 | 1.9 |
| +CTV (Puebla)/R1 | 750.3 | 1.94 | 1.86 |
| +CTV (Puebla)/R2 | 983.2 | 1.95 | 1.93 |
| +CTV (Puebla)/R3 | 756.7 | 1.97 | 1.81 |

^x CLas: *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CTV: *Citrus tristeza virus*; R₁₋₃: repetición.

^x CLas: *Candidatus Liberibacter asiaticus*; CTV: *Citrus tristeza virus*; R₁₋₃: replicates.

^z Tasa de densidad óptica obtenida con dos longitudes de onda luz UV.

^z Optical density rate obtained with two UV light wavelengths.

obtenidas fueron suficientes para homogenizar una submuestra de 50 ng μL^{-1} . Esta etapa fue indispensable para la correcta comparación de la expresión diferencial entre los genes evaluados evitando sobre o subestimarlos. La tasa de densidad óptica (260/280) estuvo en el rango 1.93-2.01 (Cuadro 1), lo cual implicó que la calidad y pureza de los ácidos nucleicos estuvo dentro de rango óptimo. Valores inferiores a 1.8 indican presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes (Taylor *et al.*, 2015).

Retrotranscripción. Para síntesis de ADNc se empleó 50 ng μL^{-1} de ARN previa homogenización con agua libre de nucleasas. La retrotranscripción con oligos dT se realizó en dos etapas mediante un protocolo no comercial. Se realizaron cinco ensayos con el fin de optimizar la concentración de ADNc (Cuadro 2). La mezcla de reacción de la primera etapa se incubó a 85 °C por 3 min en un termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. Transcurrido

was incubated at 85 °C for 3 min in a Bio-Rad T100™ Thermal Cycler, thereafter the samples were placed in ice for 5 min.

Further, the volume corresponding to the reaction mixture of the second stage was added into each tube. Trials 1 and 2 were incubated at 44 °C for 60 min, whereas trials 3-5 were incubated at 44 °C for 100 min. In all trials, retrotranscriptase was deactivated at 92 °C for 10 min. The cDNA obtained was kept at -20 °C and quantified by spectrophotometry using the NanoDrop 2000 to evaluate the yield obtained.

The cDNA synthesis was carried out successfully by incubating at 44 °C for 100 min with the trial 5 configuration. This trial extended the time of enzymatic synthesis, which helped obtain average concentrations of 1069 ng μL^{-1} . The remaining trials produced lower average yields with 666-680 ng μL^{-1} (trials 1 and 4) and 865-880 ng μL^{-1} (trials 2 and 3). An optimum yield guarantees enough

Cuadro 2. Reactivos y volumen empleado en cinco ensayos para generar una mezcla óptima de reacción (1X) aplicable a la primera y segunda etapa de retrotranscripción (RT) a partir de ARN total obtenido de tejido foliar de *C. sinensis* con tres condiciones sanitarias.
Table 2. Reagents and volume used in five trials to generate an optimum reaction mixture (1X), applicable to the first and second stages of retrotranscription (RT) from total RNA obtained from *C. sinensis* foliar tissue with three sanitary conditions.

| Primera etapa de retrotranscripción | | | | | |
|---|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| Reactivos | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Ensayo 4 | Ensayo 5 |
| RNA (50 ng μL^{-1}) | 3.00 ^y | 3.0 | 3.50 | 3.00 | 3.00 |
| ^z Oligo (dT) ₁₅ Iniciador (50 mM) | 0.25 | 0.3 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| H ₂ O libre de nucleasas | 10.50 | 9.2 | 13.25 | 14.35 | 8.75 |
| Volumen final (μL) | 13.75 | 12.5 | 17.25 | 16.85 | 12.25 |
| Segunda etapa de retrotranscripción | | | | | |
| ^z Buffer-RT (5X) | 4.00 | 4.0 | 4.50 | 4.20 | 4.50 |
| ^z dNTP Mix (10 mM) | 1.00 | 1.2 | 1.50 | 1.20 | 1.50 |
| ^z M-MLV (2000 U μL^{-1}) | 1.00 | 2.0 | 1.00 | 1.50 | 1.50 |
| ^z RNasin (40 U μL^{-1}) | 0.25 | 0.3 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Volumen final (μL) | 20.00 | 20.0 | 25.00 | 25.00 | 20.00 |

^yTodas las cantidades por ensayo en μL . / ^yAll amounts per trial in μL .

^zProveedor: Promega Corp. USA. / ^zSupplier: Promega Corp. USA.

este tiempo las muestras fueron colocadas en hielo durante 5 min.

Posteriormente, a cada tubo se adicionó el volumen correspondiente a la mezcla de reacción de la segunda etapa. El ensayo 1 y 2 se incubaron a 44 °C por 60 min, mientras que los ensayos 3-5 se incubaron a 44 °C por 100 min. En todos los ensayos se desactivó la retrotranscriptasa a 92 °C por 10 min. El ADNc obtenido se mantuvo a -20 °C y se cuantificó por espectrofotometría empleando el NanoDrop 2000 para evaluar el rendimiento obtenido.

La síntesis de ADNc se realizó exitosamente incubando a 44 °C por 100 min mediante la configuración del ensayo 5. Este ensayo prolongó el tiempo de síntesis enzimática lo cual permitió obtener concentraciones promedio de 1069 ng μL^{-1} . Los ensayos restantes generaron rendimientos promedio menores con 666-680 ng μL^{-1} (ensayo 1 y 4) y 865-880 ng μL^{-1} (ensayos 2 y 3). Un óptimo rendimiento garantiza la cantidad suficiente de ADNc para implementar RT-qPCR simultáneos con varios iniciadores asociados a múltiples genes. También reduce reactivos y consumibles empleados por muestra. Por otra parte, el Oligo-dT es empleado en 40% de ensayos RT-qPCR debido a que se hibrida a las colas de poly A de ARNm en comparación con un iniciador aleatorio alternativo. La combinación de ambos iniciadores se considera la mejor opción de optimización (Taylor *et al.*, 2015).

Genes de referencia. Cinco genes de referencia o constitutivos se seleccionaron bibliográficamente debido a su condición altamente conservada en organismos eucariotas. Estos genes tienen expresión continua e independiente de una condición fitosanitaria (Cuadro 3). Posteriormente, se evaluó su viabilidad para normalizar la expresión de genes potencialmente asociados con resistencia adquirida bajo las condiciones experimentales de este trabajo. Para este fin se empleó el gen endógeno *CDR13*,

amounts of cDNA to implement simultaneous RT-qPCR with several primers related to multiple genes. It also reduces reagents and laboratory materials used for every sample. On the other hand, Oligo-dT is used in 40% of RT-qPCR trials, since it hybridizes to mRNA through the poly-A tail in comparison with an alternative random primer. However, the combination of both primer types is considered the best optimization option (Taylor *et al.*, 2015).

Reference genes. Five reference or housekeeping genes were bibliographically selected for their highly conserved condition in eukaryotic organisms. These genes have a continuous expression, independent to a phytosanitary condition (Table 3). We later evaluated its feasibility to normalize the expression of potentially associated genes with systemic acquired resistance under the experimental conditions of this investigation. For this purpose, the endogenous gene *CDR13* was used, which has been related to this type of resistance in citrus plants (Rawat *et al.*, 2017). The primers used to detect and quantify the transcribed product of this gene were F: CAAGCTGATATAATACCCAATATCGGAG, and R: GAGGCTCGCACTGCGT (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016).

RT-qPCR optimization. RT-qPCR was used to amplify and quantify the primary transcript (in its complementary cDNA form) of the five reference genes and the *CDR13* endogenous gene. This technique was performed on a C1000 Touch™ (Bio-Rad) equipment. For every gene, 20 and 10 μL of the final reaction volume were tested. Both mixtures contained 1X of SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (2X). For each primer, 200, 250 and 500 nM were evaluated, along with 50 ng of cDNA (Table 3). The configuration of the experiment consisted of three replications per sample obtained for each plant and the

Cuadro 3. Iniciadores empleados para amplificar el transcrito primario de cinco genes constitutivos de eucariotas seleccionados para evaluar su implementación como genes de referencia en un protocolo RT-qPCR para analizar la expresión génica inducida por la infección de CTV y CLas en *C. sinensis*/*C. aurantium*.

Table 3. Primers used to amplify the primary transcript of five eukaryotes housekeeping genes chosen to evaluate their implementation as reference genes in a RT-qPCR protocol to analyze the genic expression induced by the infection of CTV and CLas on *C. sinensis*/*C. aurantium*.

| Gen | ² Iniciador 5' - 3' | Función del gen | Referencia |
|---|---|--|--|
| <i>ACTINA</i> | F:CTGAGCGTGGCTA
TTCCTTC

R:GACTTCAGGACAG
CGGAAAC | Regula la interacción entre filamentos de actina y otras fibras de proteínas que actúan como agentes de unión | Fu <i>et al.</i> , 2016 |
| Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

(<i>GAPDH</i>) | F:GGAAGGTCAAGAT
CGGAATCAA

R:CGTCCCTCTGCAA
GATGACTCT | Produce la enzima que interfiere en óxido-reducción del proceso de glicólisis | Quiñones <i>et al.</i> , 1995
He <i>et al.</i> , 2006
Mafra <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>18S rRNA genes</i> | F:TTGGAAACTCTTT
CGCCACT
R:AGCAGACCTGGCT
ATTATACGACTG | Producen la subunidad 18S del RNA ribosomal involucrado en la síntesis de proteínas | Quiñones <i>et al.</i> , 1995
He <i>et al.</i> , 2006
Yan <i>et al.</i> , 2012 |
| Citocromo C Oxidasa

(<i>COX</i>) | F:GTATGCCACGTCG
CATTCCAGA

R:GAATGCCCTTAGC
AGTTTTGGCT | Sintetiza la enzima que cataliza la cadena de transporte de electrones de la unidad citocromo c- oxidasa a la molécula de oxígeno y es clave en la respiración celular | Quiñones <i>et al.</i> , 1995
He <i>et al.</i> , 2006
Li <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>F-BOX</i> | F:TTGGAAACTCTTT
CGCCACT
R:AGCAGACCTGGCT
ATTATACGACTG | Genera la proteína relacionada con el reconocimiento de sustrato de la ubiquitina ligasa | Xu <i>et al.</i> , 2008
Mafra <i>et al.</i> , 2012
Chen <i>et al.</i> , 2018 |

²F: 'forward'; R:'reverse'

el cual se ha asociado con este tipo de resistencia en cítricos (Rawat *et al.*, 2017). Los iniciadores o cebadores empleados para detectar y cuantificar el producto transcrito de este gen fueron F: CA-AGCTGATATAATACCCAATATCGGAG, y R: GAGGCTCGCACTGCGT (Rawat *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016).

Optimización de RT-qPCR. La técnica RT-qPCR se empleó para amplificar y cuantificar el transcri-

phytosanitary condition. Each replication was used to amplify the transcript of each reference gene and the endogenous gene. The same number of 'not target controls' were included for each primer. In total, the experiment included a total of 135 RT-qPCR tests. The amplification efficiency for each primer was evaluated with a dynamic range of $1 \times 10^3 - 1 \times 10^{-1}$ cDNA with a 1:10 dilution factor. Two thermocycling programs were evaluated: the first one consisted of denaturalization at 95 °C for

to primario (en su forma complementaria ADNc) de los cinco *genes de referencia* y del gen de endógeno *CDR13*, para lo cual se empleó el equipo C1000 Touch™ (Bio-Rad). Con fines de optimizar la técnica, por cada gen se probaron 20 y 10 µL de volumen final de reacción. Ambas mezclas contenían 1X de SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (2X). Así mismo, se evaluaron 200, 250 y 500 nM de cada iniciador y 50 ng de ADNc (Cuadro 3). La configuración del experimento consistió en tres replicas por cada muestra obtenida por planta y condición fitosanitaria. Cada replica se usó para amplificar el transcrito de cada gen de referencia y el gen endógeno. Se incluyó el mismo número de testigos negativos por cada iniciador. En total, el experimento consistió de 135 pruebas RT-qPCR. Se evaluó la eficiencia de amplificación de cada iniciador mediante un rango dinámico de 1×10^3 – 1×10^{-1} ADNc con factor de dilución 1:10. Se evaluaron dos programas de termociclaje: el primero consistió de desnaturalización a 95 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos 95 °C por 5 s y un gradiente de temperatura de anillamiento, para lo cual se evaluó el rango 57-60 °C por 30 s. El segundo programa incluyó desnaturalización a 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s y anillamiento a 57 °C por 40 s. Para ambos programas de amplificación se evaluaron tres rangos de temperatura para generar curvas de disociación con incrementos de 0.5 °C/ciclo: A) 70-85 °C; B) 60-95 °C, y C) 65-95 °C.

La forma de curva y valores bajos del umbral de amplificación (Ct) para cada muestra, así como la identificación de la temperatura óptima de disociación T_d mediante la conformación de un solo pico de amplificación fueron considerados para optimizar el protocolo RT-qPCR. Además de T_d , se verificó la amplificación específica de un simple fragmento esperado, sin la formación de dímeros, mediante electroforesis con gel de agarosa al 1.5% preparado en solución buffer TBE 1X, el cual fue sometido a

30 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s and an annealing temperature gradient in the range of 57-60 °C assessed for 30 s. The second program included denaturalization at 95 °C for 3 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s and annealing at 57 °C for 40 s. For both amplification programs, three temperature ranges were evaluated to generate melting curves with increases of 0.5 °C/cycle: A) 70-85 °C; B) 60-95 °C, and C) 65-95 °C.

The curve shape and low values of cycling threshold (Ct) per sample, as well as the identification of the optimum melting temperature (T_m) with the formation of only one amplification peak were considered to optimize the RT-qPCR protocol. In addition to T_m , the specific amplification of a single expected fragment was verified, without the formation of dimers, by electrophoresis with agarose gel at 1.5% prepared in a TBE 1X buffer solution and using 110 volts for 40 min. It was finally viewed in the UVP Bioimaging Systems photodocumenter.

The optimum multiplex RT-qPCR protocol included a final reaction volume of 10 µL with 500 nM per primer and 1X of SsoAdvanced Universal SYBR® Green. This configuration reduces the amount of primers without affecting the Ct or T_m . However, due to the accuracy required in the quantification, the use of probes may be another alternative to SYBR® Green. The thermal profile included initial denaturalization at 95 °C for 30 s, followed by 40 amplification cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s.

The T_m was estimated with the temperature related to the single peak of the melting curve for each primer of *GAPDH* (81°C), *F-BOX* (83.5) and *ACTIN* (84) transcripts (Figure 1A, B). The primer associated with *18S rRNA* gene produced a moderate peak at different temperatures for healthy plant samples and those infected with CTV and CLas, as opposed to what would be expected of

110 voltios durante 40 min. Finalmente se visualizó en el fotodocumentador UVP Bioimaging Systems.

El protocolo óptimo monoplex RT-qPCR incluyó un volumen final de reacción de 10 uL con 500 nM por iniciador y 1X de SsoAdvanced Universal SYBR® Green. Esto permite reducir la cantidad de reactivos sin afectar el Ct o T_d. Sin embargo, debido a la precisión requerida en la cuantificación el empleo de sondas puede ser otra opción al SYBR® Green. El perfil térmico elegido incluyó desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 s, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 5 s y 60 °C durante 30 s.

La T_d se estimó con la temperatura asociada al pico único de la curva de disociación para cada iniciador de los transcritos de *GAPDH* (81 °C), *F-BOX* (83.5) y *ACTINA* (84) (Figura 1A, B). El iniciador asociado al gen *18S rRNA* conformó un pico moderado a diferentes temperatura para las muestras vegetales sanas e infectadas con CTV y CLas contrario a lo que se esperaría de un gen de referencia (Figura 1B). En el caso de *COX* no se conformó una curva de disociación por lo que ambos se eliminaron para su posible uso como *genes de referencia*. El gen putativo de resistencia *CDR13* tuvo una T_d de 81 °C (Figura 1C). La curva de disociación con pico único indicó que no existen problemas de hibridación específica, concentración del iniciador o condiciones ineficientes de reacción del iniciador (Taylor *et al.*, 2015).

Las curvas de amplificación con los iniciadores asociados a *ACTINA* y *GADPH* mostraron Ct constantes entre 22.5-26 con 3500-4200 RFU (Unidades relativas de fluorescencia) para las muestras vegetales sanas e infectadas con CLas y CTV. (Figura 1D), mientras que el gen *F-BOX* presentó Ct entre 25-27 con similar RFU (Figura 1E). El iniciador relativo al gen *18S rRNA* tuvo Ct tardíos de 35-37 con 600 RFU (Figura 1E), congruente con la curva de disociación inadecuada, lo que confirmó

a *reference gene* (Figure 1B). In the case of *COX*, a melting curve was not produced, and therefore, they were both discarded for use as *reference genes*. Putative resistance gene *CDR13* had a T_m of 81 °C (Figure 1C). The single-peak melting curve indicated no problems regarding specific hybridization, primer concentration, or inefficient primer reaction conditions (Taylor *et al.*, 2015).

The amplification curves with the primers related to *ACTIN* and *GADPH* displayed Ct constants between 22.5-26 with 3500-4200 RFU (Relative fluorescence units) for the healthy plant samples and those infected with CTV and CLas (Figure 1D), whereas gene *F-BOX* displayed Ct between 25-27 with a similar RFU (Figure 1E). The primer related to *18S rRNA* gene had Ct's in the range of 35-37 with 600 RFU (Figure 1E), congruent with the inadequate melting curve, confirming its elimination. Contrary to expected, in all genes cases, samples of citrus infected with CTV showed the higher Ct's (25-27) followed by health samples (24-25), indicating possible infection effect on the expression of these genes. The amplification curve with the primer relative to *CDR13* gene had a 23 Ct for the three replicates (Figure 1F). The visualization in agarose gel of the fragments amplified per repetition was sampled with products obtained with the primers associated to *ACTIN* and *GADPH* genes. A simple band, without secondary products or dimers, confirmed the specificity of the primers used (Figure 1D).

RT-qPCR standard curve. The dynamic range was determined with four dilution factors, base 10 of cDNA (1x10³ – 1x10⁰ ng µL⁻¹), each with three replicates, in order to establish the optimum amount of cDNA required for the RT-qPCR reaction and to estimate the efficiency (E) (Taylor *et al.*, 2015). This process is illustrated with the primers related to *ACTIN* and *CDR13* genes (Figure 2A-

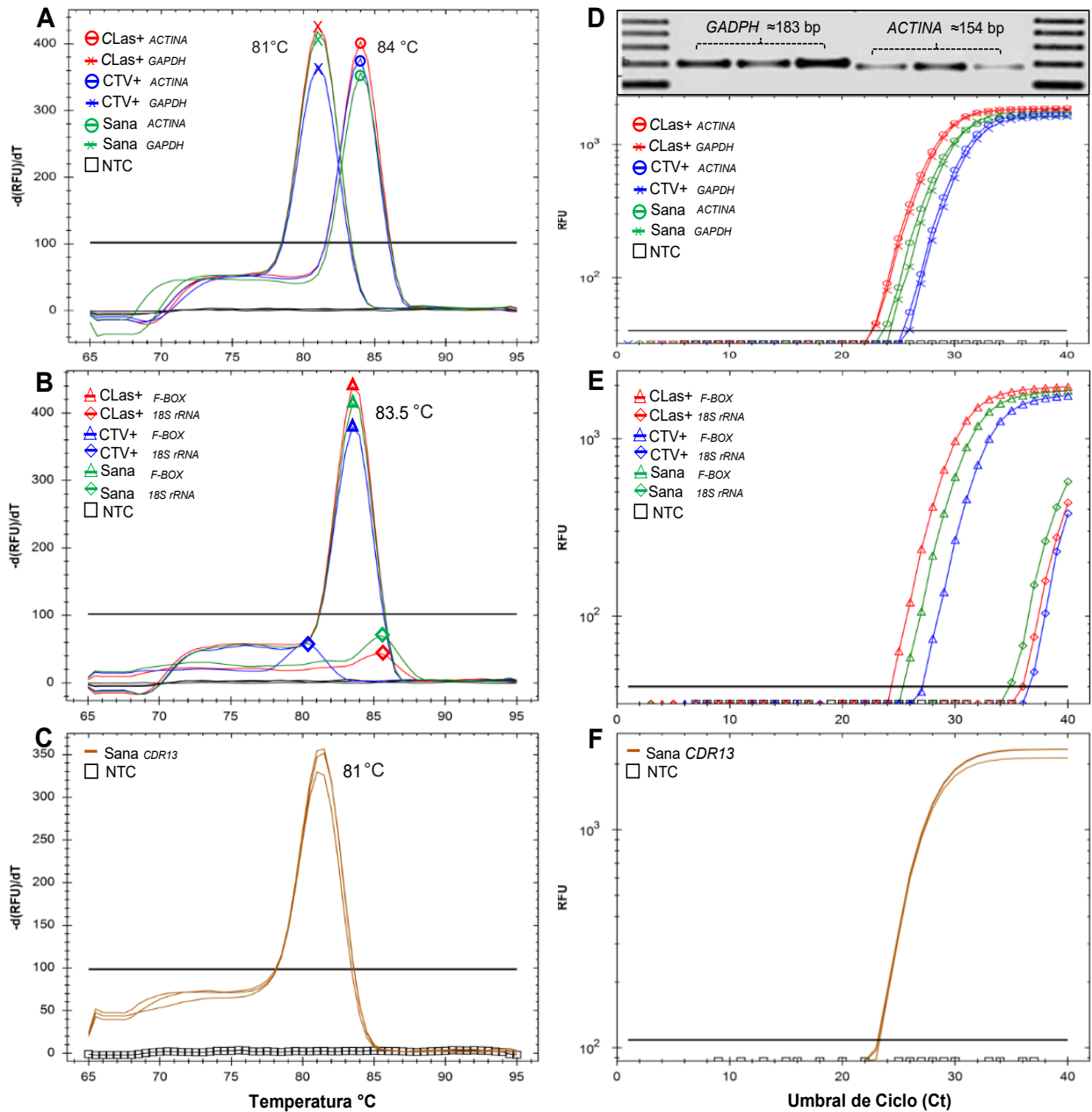


Figura 1. Curvas de disociación (A, B, C) y amplificación (D, E, F) por RT-qPCR empleando SYBR® Green para iniciadores de productos transcritos de los genes *GAPDH* y *ACTINA* (A, D), *F-BOX* y *18S rRNA* (B, E), y *CDR13* (C, F), en muestras foliares compuestas de *C. sinensis*/*C. aurantium* con tres condiciones fitosanitarias: sana (verde y café), positiva a CLas (rojo) y positiva a CTV (azul). Gel de agarosa al 1.5 % con fragmentos amplificados con iniciadores relativos a los genes *GAPDH* y *ACTINA* (D, recuadro superior).

Figure 1. Melting curves (A, B, C) and amplification curves (D, E, F) with RT-qPCR using SYBR® Green for primers targeting products transcribed from *GAPDH* and *ACTIN* (A, D), *F-BOX* and *18S rRNA* (B, E) and *CDR13* (C, F) gen using composed samples of leaves of *C. sinensis*/*C. aurantium* with three phytosanitary conditions: healthy (green and brown), positive to CLas (red) and positive to CTV (blue). Agarose gel at 1.5 % with amplified fragments with primers related to genes *GAPDH* and *ACTIN* (D, top section).

su eliminación. Contrario a lo esperado, en todos los genes' muestras de cítricos infectados con CTV exhibió los Ct's más tardíos (25-27) seguido por las muestras sanas (24-25), indicando posible efecto de la infección en la expresión de estos genes. La curva de amplificación con el iniciador relativo al gen *CDR13* tuvo un Ct de 23 para las tres repeticiones (Figura 1F). La visualización en gel de agarosa de fragmentos amplificados por cada repetición se muestra con productos obtenidos con los iniciadores asociados a los genes *ACTINA* y *GADPH*. Una banda simple, sin productos secundarios o dímeros, confirmaron la especificidad de los iniciadores empleados (Figura 1D).

RT-qPCR curva estándar. El rango dinámico se determinó con cuatro factores de dilución base 10 de ADNc (1×10^3 – 1×10^0 ng μL^{-1}), cada uno con tres repeticiones, para establecer la cantidad óptima de ADNc requerida para la reacción RT-qPCR y para estimar la eficiencia (E) (Taylor *et al.*, 2015). Este proceso se ilustra con los iniciadores relativos a los genes *ACTINA* y *CDR13* (Figura 2A-D).

Para estos genes, la concentración de ADNc tuvo una relación inversa con valores Ct (Figura 2 A, C), permitiendo ajuste a un modelo de regresión lineal simple con pendientes negativas de -3.33 ($r^2 = 0.99$) y -3.49 ($r^2 = 0.99$), y eficiencias (E) de 99.5 y 93.3 %, respectivamente. Con la línea ajustada, se determinó 1 ng μL^{-1} como umbral mínimo de concentración ADNc en la muestra vegetal para detectar la transcripción del gen *ACTINA* con Ct = 32-33 y de *CDR13* con Ct = 33.5-34 (Figura D, E). Las eficiencias de reacción estimadas estuvieron dentro del rango 90-110 % considerado aceptable (Taylor *et al.*, 2015). Estos resultados son ilustrativos del procedimiento por lo que el rango dinámico debe ser estimado por cada gen de interés ya que la expresión génica no es homogénea (Mafra *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012).

D). For these genes, the cDNA concentration had an inverse relation with Ct values (Figure 2 A, C), allowing the adjustment to a simple linear regression model with negative slopes of -3.33 ($r^2 = 0.99$) and -3.49 ($r^2 = 0.99$), and to estimate the efficiency (E) in 99.5 and 93.3 %, respectively. With the line adjusted, 1 ng μL^{-1} was established as the minimum cDNA concentration threshold required to detect the *ACTIN* transcription with Ct = 32-33 and of *CDR13* with Ct = 33.5-34 (Figure D, E). The estimated reaction efficiencies (E) were within the 90-110% range, considered acceptable (Taylor *et al.*, 2015). These results are illustrative of the procedure, therefore the dynamic range must be estimated for each gene of interest, since the genic expression is not homogenous (Mafra *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012).

Selection of reference genes. Based on the relative quantification obtained using the optimum RT-qPCR protocol, an analysis was carried out on the stability of the expression of *GAPDH*, *ACTIN* and *F-BOX* using the program CFX Manager™ ver 3.1 by Bio-Rad. *GAPDH* and *ACTIN* had the lowest M value (0.06), therefore the highest stability was achieved with 2.84 (ln 1/M). This indicates that expression of these genes had variability attributable mostly to the experimental process, but not to the infection by CLAs or CTV, which was expected from a *reference gene* (Figure 3). Nevertheless, $M < 0.5$ is considered acceptable for normalization purposes. Due to the synchrony of *GAPDH* and *ACTIN* (Figure 3), the use of both genes is recommended for normalization purposes. Mafra and collaborators (2012) evaluated a set of genes, including *ACTIN*, *GAPDH*, *F-BOX* and *18S rRNA* in different citrus species and rootstocks. They conclusively identified only *F-BOX* as the most stable. *18S rRNA* and *ACTB* genes have also been reported effective (Yan *et*

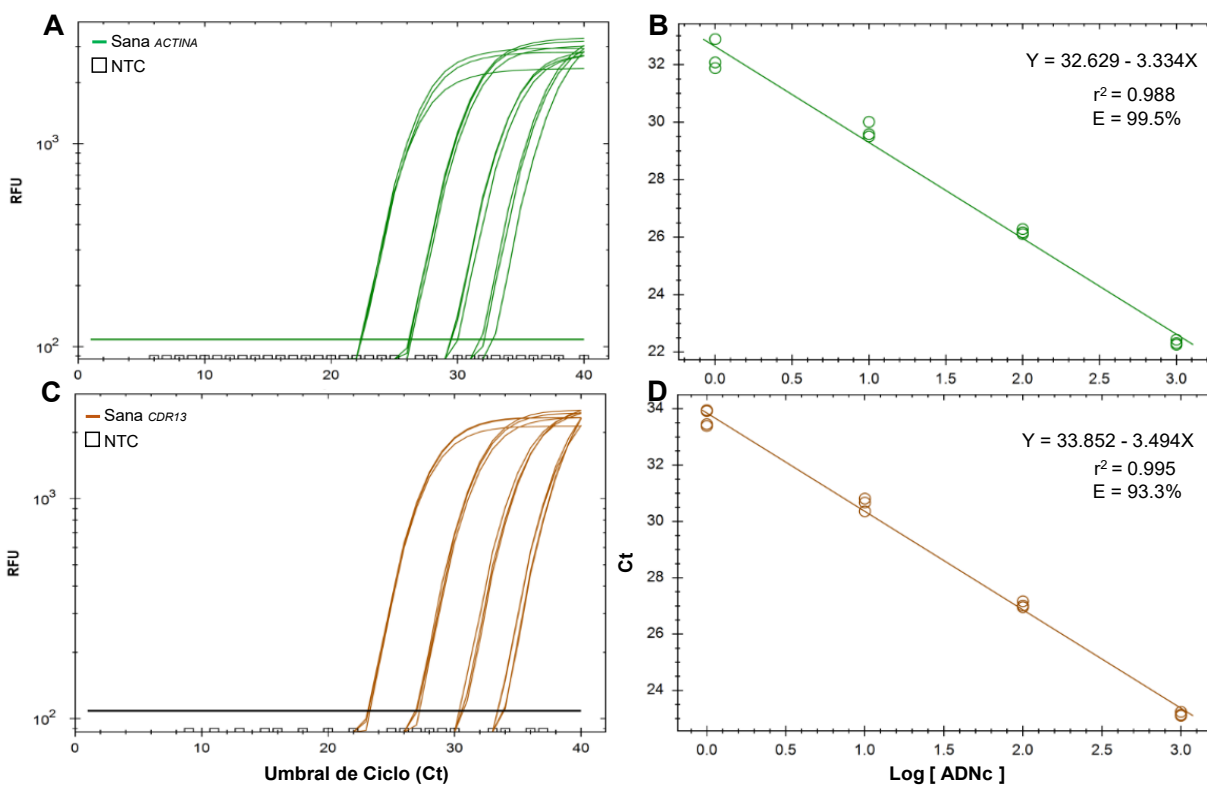


Figura 2. Curvas de estandarización y ajuste a un modelo de regresión lineal simple de las reacciones RT-qPCR obtenidas de cuatro factores de dilución (1×10^3 – 1×10^0) de ADNc empleado como template para iniciadores asociados a la expresión de *ACTINA* (A, B) y *CDR13* (C, D). E= eficiencia de la reacción.

Figure 2. Standardization curves and adjustment to a simple linear regression model of the RT-qPCR reactions obtained from four dilution factors (1×10^3 – 1×10^0) of cDNA used as a template for primers related to the expression of *ACTIN* (A, B) and *CDR13* (C, D). E= reaction efficiency.

Selección de genes de referencia. Con base en la cuantificación relativa obtenida con el protocolo RT-qPCR óptimo se procedió a analizar la estabilidad de la expresión de *GAPDH*, *ACTINA* y *F-BOX* mediante el programa CFX Manager™ ver 3.1 de Bio-Rad. *GAPDH* y *ACTINA* tuvieron el menor valor de M (0.059) por lo que tuvieron la mayor estabilidad con 2.84 ($\ln 1/M$). Esto indica que la expresión de estos genes tuvieron una variabilidad atribuible al proceso experimental pero no a la infección por CLAs o CTV lo cual era esperado para un *gen de referencia* (Figura 3). Sin embargo, $M < 0.5$ se considera aceptable efectos de normalización.

et al., 2012). These results indicate that the selection of *reference genes*, before a specific study of *systemic acquired resistance*, requires evaluation in the specific experimental conditions and with the biological material of interest. Likewise, it is crucial to optimize the RT-qPCR protocol with the designed or chosen primer(s), the plant sample and experimental goal (Taylor *et al.*, 2015). This investigation also identified the importance of standardizing the experimental units as much as possible, since the expressions of constitutive genes may be influenced by abiotic factors such as water stress and temperature.

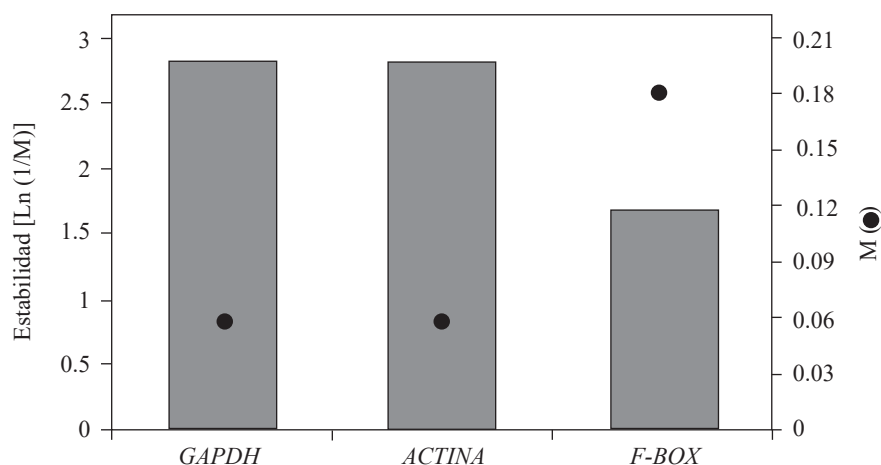


Figura 3. Estabilidad y promedio de variación de expresión entre pares de *genes de referencia* (M) obtenidos a partir de cuantificación por RT-qPCR de muestras de nervadura central de hojas de naranjo dulce (*C. sinensis/C. aurantium*) sanas e infectadas con CLAs y CTV.

Figure 3. Stability and average of expression variation between pairs of *reference genes* (M) obtained from quantifying by RT-qPCR central leaf nervation taken from orange trees (*C. sinensis/C. aurantium*), both healthy and infected with CLAs and CTV.

Por la sincronía de GAPDH y ACTINA (Figura 3), el empleo de ambos genes para fines de normalización son recomendables. Mafra y colaboradores (2012) evaluaron un conjunto de genes, entre los que se incluían *ACTINA*, *GAPDH*, *F-BOX* y *18S rRNA* en diferentes especies cítricas y porta injertos. Conclusivamente, identificaron únicamente a *F-BOX* como el más estable. También se han reportado a los genes *18S rRNA* y *ACTB* (Yan *et al.*, 2012). Estos resultados indican que la selección de *genes de referencia*, previo a un estudio específico de *resistencia genética adquirida*, requiere evaluarse en las condiciones experimentales y con el material biológico de interés. Adicionalmente, es fundamental optimizar el protocolo RT-qPCR con el iniciador(es) diseñado o elegido en función al tipo de muestra vegetal y objetivo experimental (Taylor *et al.*, 2015). En este trabajo también se identificó la importancia de estandarizar al máximo las unidades experimentales ya la expresión de genes constitutivos pueden ser influenciados por factores abióticos como estrés hídrico y temperatura.

In conclusion, an in-house, non-commercial RT-qPCR protocol was successfully developed to normalize the endogenous gene *CDR13*, associated with *systemic acquired resistance* in sweet orange. The *GAPDH*, *ACTIN* and *F-BOX* *reference genes* presented melting curves expressing no dimers formation, $Ct \leq 28$ and reaction efficiencies in the 90-110% range. However, *GAPDH* and *ACTIN* had the most stable genic expression (2.83) and are therefore proposed for the normalization of the expression of potentially endogenous genes in resistance studies of *C. sinensis/C. aurantium* in response to infections by CTV and CLAs under experimental conditions, analogous to those used in this investigation.

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

En conclusión, se desarrolló exitosamente un protocolo de laboratorio, no comercial, RT-qPCR para normalizar el gen endógeno *CDR13*, asociado con resistencia sistémica adquirida en cítricos. Los genes de referencia *GAPDH*, *ACTINA* y *F-BOX* exhibieron curvas de disociación sin expresión de dímeros,  $Ct \leq 28$  y eficiencias de reacción en el rango de 90-110%. Sin embargo, *GAPDH* y *ACTINA* tuvieron la expresión génica más estable (2.83) por lo que estos genes se proponen para normalizar la expresión de genes endógenos potenciales en estudios de resistencia de *C. sinensis*/*C. aurantium* en respuesta a la infección de CTV y CLas en condiciones experimentales análogas a las de este estudio.

## LITERATURA CITADA

- Chen H, Palmer IA, Chen J, Chang M, Thompson SL, Liu F and Fu Z Q. 2018. Specific and accurate detection of the citrus greening pathogen *Candidatus Liberibacter* spp. using conventional PCR on citrus leaf tissue samples. *Journal of Visualized Experiments* 136: e57240. <https://dx.doi.org/10.3791/57240>
- Dawson W, Bar-Joseph M, Garnsey S and Moreno P. 2015. *Citrus Tristeza Virus*: Making an ally from an enemy *Annual Review of Phytopathology* 53: 137-155. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>
- Domínguez-Monge S, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, Gutiérrez-Espinosa MA, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Ochoa-Martínez D, Febres V, Hernández-Nava G, y Martínez-Bustamante V. 2014. Epidemiología molecular de aislamientos de Citrus Tristeza Virus de la Península de Yucatán. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(Suplemento): S46. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento322014.html>
- Esquivel-Chávez F, Mora-Aguilera G, Velázquez-Monreal J, Valdovinos-Ponce G, Gutiérrez-Espinosa MA y Loeza-Kuk E. 2015. Análisis morfo-anatómico de *Citrus aurantifolia* infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus* e injertado en tres patrones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(Suplemento): S199. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ., Manzanilla-Ramírez MA y Flores-Sánchez J. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas asociados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n8/v46n8a3.pdf>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2015. Yield loss caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Persian lime, in Yucatan Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 33(2): 195-210. <https://www.rmfmf.org.mx/Vol3322015/AC/AC5.pdf>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal J J, Domínguez-Monge S, Bassanezi R B, 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://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Fu S, Shao J, Zhou C and Hartung JS. 2016. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and two strains of *Citrus Tristeza Virus*. *BMC Genomics* 11(17):394. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2663-9>
- Green MR and Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 4th ed. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2028p.
- Gutiérrez-Espinosa MA, Luth D and Moore GA. 1997. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Plant Cell Reports* 16: 745-753. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002990050313>
- He C, Molena A, Xiong X, Boit G and Nie X. 2006. Cytochrome c oxidase mRNA as an internal control for detection of *Potato virus Y* and *Potato leafroll virus* from single aphids by a co-amplification RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 138 (1-2):152-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.007>
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66(1):104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Loeza-Kuk E, Gutiérrez-Espinosa MA, Ochoa-Martínez D, Villegas-Monter A, Mora-Aguilera G, Palacios-Torres EC y Pérez-Molphe-Balch E. 2011. Análisis de la resistencia en pomelo y limón mexicano transformados con el gen p25 del *Citrus tristeza virus*. *Agrociencia* 45 (1):55-65. ISSN 2521-9766 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30219760006>
- Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava LP, Rodrigues CM and Machado MA. 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *Plos One* 7(2): e31263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031263>
- Mafra V, Martins P, Francisco C, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J and Machado M. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genomics* 14(1):247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-247>
- Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE y Mora-Aguilera G. 2020. Epidemiología regional de Citrus tristeza virus en Veracruz. *Revista*

- Mexicana de Fitopatología 38(Suplemento): S131. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento382020.html>
- Martínez-Bustamante V, López-Bautista V, Alanís-Martínez I, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Loeza-Kuk E, Robles-García P y Esquivel-Chávez F. 2015. Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el dosel de naranjo (*Citrus sinensis*), con infección asintomática. Revista Mexicana de Fitopatología 33(Suplemento): S201. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JL, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa A and Loeza-Kuk E. 2014a. Current situation and perspectives for management of Citrus HLB. Mexican Journal of Phytopathology 32(2): 108-119. [https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2\\_03.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf)
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez F, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salín C, Flores-Olivas A, González-Gómez R y Robles-García P. 2014b. 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://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2\\_04.pdf](https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_04.pdf)
- Quiñones V, Zanlungo S, Holuigue L, Litvak S and Jordana X. 1995. The Cox1 initiation codon is by RNA editing in potato mitochondria. Plant Physiology 108(3): 1327-1328. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.3.1327>
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan Y, Bowman KD, Gmitter FG and Deng Z. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. Horticulture Research 4: 17064. <http://dx.doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Rivas-Valencia P, Loeza-Kuk E, Mora-Aguilera G, Ruiz-García N, Ochoa-Martínez D, Gutiérrez-Espinosa A y Febres V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del Citrus tristeza virus de Yucatán y Tamaulipas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1(4): 493-507. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v1n4/v1n4a4.pdf>
- Rivera-López S, Perales-Salvador A, Del Valle-Sánchez M y Caamal-Cauich I. 2020. Panorama de la producción y comercialización de naranja en México. Agro Productividad 13(7): 9-14. <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1614>
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal J, Manzanilla-Ramírez AM, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI y Flores-Virgen R. 2013. Síntomas de Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm] Swingle) y su dispersión en el estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1):15-31. <https://dx.doi.org/10.5154/rchsh.2012.01.005>
- SIAP. 2019. Panorama agroalimentario 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en línea en: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019)
- Soares JM, Tanwir SE, Grosser JW and Dutt M. 2020. Development of genetically modified citrus plants for the control of citrus canker and huanglongbing. Tropical Plant Pathology 45: 237-250. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00362-9>
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M and Nguyen M. 2015. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA. 94547. Bulletin 5859. [https://www.bio-rad.com/literature/Bulletin\\_5859](https://www.bio-rad.com/literature/Bulletin_5859)
- Ventura-Medina PI, Gutiérrez-Espinosa MA, Febres V, Mora-Aguilera G and Robledo-Paz A. 2019. Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to pathogens in citrus including CLas and CTV. Mexican Journal of Phytopathology 37(3):399-420. <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1906-6>
- Xu G, Ma H, Nei M and Kong H. 2008. Evolution of *F-Box* genes in plants in plants: Different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(3): 835-840. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812043106>
- Yan J, Yuan F, Long G and Deng Z. 2012. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. Molecular Biology Reports 39(2): 1831-1838. <https://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-0925-9>