

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 41, NÚMERO 3, Septiembre 2023



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

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Editora Técnica * Technical Editor

Dra. Norma Ávila Alistac, UACH

Composición Web y RMFito * Web and RMFito Composition

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

Editoras Adjuntas * Senior Editors

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Vicente Febres, UF, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Rodrigo Valverde, LSU AgCenter, USA

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

Dra. Graciela Ávila Quezada, UACH

Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP

Dra. Nataly Quiroz González, UNAM

Dra. Liliana Carolina Córdova Albores, UdeG

Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa, COLPOS

Dr. Dimas Mejía Sánchez, UACH

Dr. Rómulo García Velasco, UAEM

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro

Dr. Alejandro C. Michel Aceves, CSAEGRO

Portada: Planta y frutos sanos de uchuva (*Physalis peruviana*) (izquierda). Síntomas y signo de *Botrytis cinerea* en frutos de uchuva en campo e inoculados en condiciones de laboratorio (derecha).

Original: Zapata-Narváez YA, Díaz-García A y Beltrán-Acosta CR.
Páginas: 380-381.

LETTER TO EDITOR* CARTA AL EDITOR

Multidiscipline, a basic component of innovation in the biological control of plant pathogens * Multidisciplina, componente fundamental de la innovación en el control biológico de fitopatógenos. 319

Galindo E.

SCIENTIFIC ARTICLES * ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Identification of species and physiological races of *Xanthomonas* isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) and chili pepper (*Capsicum annuum*) in Sinaloa, Mexico * Identificación de especies y razas fisiológicas de *Xanthomonas* aisladas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*) en Sinaloa, México. 326

Tapia-de la Barrera LB, Báez-Sañudo MA, García-Estrada S, Tovar-Pedraza JM and Carrillo-Fasio JA.

Biodegradable films with fungistatic activity for the postharvest control of *Fusarium solani* in Hass avocado fruit * Películas biodegradables con actividad fungistática para el control postcosecha de *Fusarium solani* en fruto de aguacate Hass. 343

Coyotl-Pérez WA, Villa-Ruano N and Rubio-Rosas E.

Alternatives for the gray mold (*Botrytis cinerea*) control in cape gooseberry (*Physalis peruviana*) crop * Alternativas para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*). 372

Zapata-Narváez YA, Díaz-García A and Beltrán-Acosta CR.

Biofilm of epiphytic algae and fungi in forest plantations of pinabete (*Abies guatemalensis*) in Guatemala * Biopelícula de algas epífitas y hongos en plantaciones forestales de pinabete (*Abies guatemalensis*) en Guatemala. 391

Villalobos A, Dubón AL, Álvarez MR, Osorio S and Palmieri M.

Effect of adjuvants, fungicides and insecticides on the growth of *Trichoderma koningiopsis* Th003 * Efecto de coadyuvantes, fungicidas e insecticidas sobre el crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003. 412

Zapata-Narváez YA and Botina-Azain BL.

Gene silencing induced by the vector EuMY-YPΔCHS4 during the *Fusarium* sp. - *Nicotiana benthamiana* interaction * Silenciamiento génico inducido por el vector EuMY-YPΔCHS4 durante la interacción *Fusarium* sp.-*Nicotiana benthamiana*.

Hau-Yama NE, Luna-Rivero MS, Canto-Canché BB, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C, Sánchez-Rangel D and Moreno-Valenzuela OA.

434

Pathogenicity, virulence and *in vitro* sensitivity of *Elsinoe perseae* (= *Sphaceloma perseae*) isolates to different fungicides * Patogenicidad, virulencia y sensibilidad *in vitro* de aislados de *Elsinoe perseae* (= *Sphaceloma perseae*) a diferentes fungicidas.

Esquivel-Miguel E, Morales-García JL, Pedraza-Santos ME, Chávez-Bárceñas AT, García-Morales S and Pineda-Guillermo S.

460

REVIEW ARTICLES * ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Considerations about interference RNA for the control of fungal diseases in Mexican and Latin American agriculture * Consideraciones sobre el ARN de interferencia para el control de enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas en México y América Latina.

Couoh-Dzul OJ, Carreón-Anguiano KG, Moreno-Valenzuela OA and Canto-Canché B.

479

PHYTOPATHOLOGICAL NOTES * NOTAS FITOPATOLÓGICAS

In vitro* antagonism of *Trichoderma* against *Rhizoctonia solani * Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia solani*.

Pérez-González JO, Ramírez-Rojas SG, Rocha-Rodríguez R, Ornelas-Ocampo K, Vázquez-Alvarado JMP, Hernández-Guzmán FJ and Garduño-Audelo M.

514

Diagrammatic scale to evaluate the severity of gray mold (*Botrytis cinerea*) in pomegranate * Escala diagramática para evaluar la severidad del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de granada.

Patricio-Hernández A, Mercado-Flores Y, Téllez-Jurado A, Ramírez-Vargas MdelR and Quezada-Salinas A.

524

LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

Multidiscipline, a basic component of innovation in the biological control of plant pathogens

Multidisciplina, componente fundamental de la innovación en el control biológico de fitopatógenos

Enrique Galindo, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62271 and Agro&Biotecnia S. de R.L. de C.V., Limones 8, Amate Redondo, 62334, Cuernavaca, Morelos, México.
Corresponding author: enrique.galindo@ibt.unam.mx

Received: August 03, 2023.

Accepted: August 12, 2023.

Galindo E. 2023. Multidiscipline, a basic component of innovation in the biological control of plant pathogens. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(3): 319-325.
DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2308-1>

First DOI publication: August 24, 2023.

Primera publicación DOI: 24 de Agosto, 2023.

The control of biotic diseases in agriculture — particularly of those caused by fungi and bacteria— has produced an excessive use of chemically-synthesized products (agrochemicals), which, despite their important contribution to the increase of agricultural productivity, have considerable disadvantages, especially regarding the health of the people who apply these products and in environmental terms, since they contaminate soils and groundwater layers. On the other hand, the use of pesticide-free agricultural products has increased in recent years, requiring quality foods,

El control de enfermedades bióticas en la agricultura —sobre todo de aquellas causadas por hongos y bacterias—, ha generado el excesivo uso de productos elaborados por síntesis química (agroquímicos); los cuales, a pesar de su contribución de manera importante para incrementar la productividad agrícola, tienen desventajas considerables, sobre todo en términos de salud de quienes aplican estos productos y en términos ambientales, ya que contaminan suelos y mantos freáticos. Por otra parte, el consumo de productos agrícolas libres de pesticidas se ha incrementado en los últimos años, requiriendo alimentos de calidad y sin residuos de compuestos tóxicos. Aunado a esto, la legislación (especialmente en países desarrollados) limita cada vez más el uso de pesticidas para productos de consumo humano. Una alternativa más sustentable es el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenos mediante el uso de sus enemigos/antagonistas, los cuales son considerados como agentes de control biológico

free of toxic components. Alongside this, legislation (especially in developed nations) increasingly limits the use of pesticides on products for human consumption. A more sustainable alternative is the biological control of phytopathogenic fungi and bacteria with the use of their enemies/antagonists, which are considered biological control agents (BCA). In this field, I highlight the recent review by Lahlali *et al.* (2022) which describes extensively diverse aspects referring to the biological control of phytopathogens, including an analysis of the action mechanisms used by beneficial microorganisms for controlling the phytopathogens and the reduction of the losses caused by them, as well as the potential and limitations of this technology. This review paper also analyzes the reality that has characterized this field: an extensive scientific literature in which numerous isolations of microorganisms with antagonistic potential have been evaluated and reported, though showing that relatively few products have reached the market. An example of this has been pointed out by Córdova-Albores and collaborators (2021), who have shown the need for a greater biodiversity of biopesticides registered in COFEPRIS (Spanish acronym for the Federal Commission for the Protection against Sanitary Risk) and sold in Mexico. Lahlali *et al.* (2022) analyze the causes for this situation and conclude that researchers ignore or have not considered what is really needed for a product to be able to reach farmers and which has to do with aspects that go far beyond the evaluation of the biological effectiveness of a particular BCA. Nationally, Serrano-Carreón and Rincón-Enríquez (2021) have edited a special number of the dissemination journal “Biotecnología en Movimiento” around the situation of the biological control of pests and diseases in Mexico and in which some experiences with a potential for application are told.

The concept of microbial antagonism has been known in microbiology since the 19th century;

(ACB). Sobre el campo, resalto la revisión reciente de Lahlali *et al.* (2022) que describe de forma muy amplia diversos aspectos referentes al control biológico de fitopatógenos, incluyendo un análisis de los mecanismos de acción que utilizan los microorganismos benéficos para controlar a los fitopatógenos y disminuir pérdidas causadas por éstos, así como del potencial y limitaciones de esta tecnología. El artículo también analiza la realidad que ha caracterizado a este campo: una extensa literatura científica en la que se han evaluado y reportado numerosos aislamientos de microorganismos con potencial antagonico, aunque evidenciando que relativamente pocos productos han llegado al mercado. Ejemplo de ello lo señalan Córdova-Albores y colaboradores (2021) donde evidenciaron la necesidad de mayor diversidad de bioplaguicidas registrados en COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) y comercializados en México. Lahlali *et al.* (2022) analizan las causas de esta situación y llegan a la conclusión de que los investigadores ignoran o no han considerado lo que realmente se necesita para que un producto pueda llegar a los agricultores y que tiene que ver con aspectos que van mucho más allá de la evaluación de la efectividad biológica de un ACB en particular. A nivel nacional, Serrano-Carreón y Rincón-Enríquez (2021) han editado un número especial en la revista de divulgación “Biotecnología en Movimiento” en torno a la situación del control biológico de plagas y enfermedades en México y en donde se relatan algunas experiencias con potencial de aplicación.

El concepto de antagonismo microbiano se conoce en microbiología desde el siglo XIX; no obstante, el primer producto registrado en la U.S. Food and Drug Administration (FDA) como agente de control biológico para la agricultura fue la cepa bacteriana *Agrobacterium radiobacter* 84, en 1979 (Lahlali *et al.*, 2022). Una década

nevertheless, the first product registered in the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as a biological control agent for agriculture was the bacterial strain *Agrobacterium radiobacter* 84, in 1979 (Lahlali *et al.*, 2022). A decade later, the same agency approved the use of the fungus *Trichoderma harzianum* to control plant diseases (Lahlali *et al.*, 2022). To date, the FDA has issued registrations for 14 different bacteria and 12 fungi as BCAs (Lahlali *et al.*, 2022), the most common of which are the bacteria of the *Bacillus* genus and the fungi of the *Trichoderma* genus. As pointed out by Köhl *et al.* (2011), most of the work on the isolation and characterization of antagonistic microorganisms have concentrated on the biological effectiveness (whether *in vitro* or *in planta*) as their main selection criterion. It is common to find the following phrase in articles frequently published in plant pathology, microbiology or biotechnology journals:

“Strain “XX”, isolated from “BB” and identified as “YY,” displays a high percentage of biocontrol over “ZZ” and “QQ,” and may therefore be a candidate for the control of these phytopathogens, which would represent an agroecological alternative for the control of “WW” in the region of “FF,” since it is a native strain that may have greater possibilities of adaptability and success, in comparison with the currently available commercial strains.”

Although it sounds obvious, it does not seem evident for most researchers that the effectiveness of a particular microbial isolation is not the only requirement to become a “candidate for the control of these phytopathogens.” It is important to analyze that, in order for a microbial isolation to be considered as an agent for the control of a phytopathogen in the field, it must meet at least the following requirements: a) It must be safe for humans and other animals, b) It must be able to product it at a large scale in low-cost culture media,

después, la misma agencia aprobó el uso del hongo *Trichoderma harzianum* para controlar enfermedades de plantas (Lahlali *et al.*, 2022). A la fecha, la FDA ha concedido registros a 14 diferentes bacterias y 12 hongos como ACBs (Lahlali *et al.*, 2022), entre los que destacan de forma primordial las bacterias del género *Bacillus* y los hongos del género *Trichoderma*. Como ha sido señalado por Köhl *et al.* (2011), la mayor parte de los trabajos de aislamiento y caracterización de microorganismos antagonistas se han concentrado en la efectividad biológica (ya sea *in vitro* o *in planta*) como su principal criterio de selección. Es común encontrar la siguiente frase en los artículos que se publican con frecuencia al respecto en revistas científicas de fitopatología, microbiología o biotecnología:

“La cepa “XX”, aislada de “BB” e identificada como “YY”, al presentar un alto porcentaje de biocontrol sobre “ZZ” y “QQ” puede ser candidata para el control de estos fitopatógenos, lo que representaría una alternativa agroecológica para el control de “WW” en la región “FF”, ya que se trata de una cepa nativa que puede tener mayores posibilidades de adaptabilidad y éxito en comparación con las cepas disponibles actualmente de manera comercial”

Aunque suena obvio, no parece ser evidente para la mayoría de los investigadores que la efectividad de un determinado aislado microbiano no es el único requisito para “ser candidata para el control de estos fitopatógenos”. Es importante analizar que, para considerar un aislado microbiano como agente de control de algún fitopatógeno en el campo, hay que cubrir -al menos- los siguientes requisitos: a) debe ser seguro para el ser humano y otros animales, b) debe reproducirse a gran escala en medios de cultivo de bajo costo, c) se debe formular de tal manera que sea fácil de usar y almacenar por los agricultores. De muy poco sirve un aislado con extraordinaria capacidad

c) It must be formulated in such a way that it is easily used and stored by farmers. An isolate with an extraordinary ability for biological control is of little use if it has a pathogenic potential for humans, or its production cannot be scaled-up in an inexpensive way, or it does not have a sufficiently broad shelf-life (i.e. two years). Additionally, it must be able to convince farmers in terms of its cost-benefits in comparison with conventional agrochemicals.

In relation to the statement claiming that “... it would represent an agroecological alternative for the control of “WW” in the region of “FF,” since it is a native strain that may have greater possibilities of adaptability and success, in comparison with the currently available commercial strains,” it is necessary to mention that, in addition to the technical-biological requirements, one of the greatest bottlenecks in the commercialization of a BCA is the high cost of the registration process before the relevant agricultural authorities, and the health authorities (such as COFEPRIS), in each country in which the product is intended for legal sale. This registration process includes the verification by third parties of the innocuousness of the product and its effectiveness against a phytopathogen in a particular crop. The latter is, in itself, a problem from a commercial point of view, since biological effectiveness tests must be carried out for each phytopathogen-crop pair to become correspondingly registered. The commercial success of biological products available in the market is largely based on its broad antagonist spectrum. There is no commercial product that can survive in the market having only one registration for a single pathogen/agricultural crop and/or for a particular agricultural zone, as the majority of the scientific literature suggests. The costs for registration are one of the most relevant factors in the placement of this type of products in the market.

para el control biológico, si éste es un potencial patógeno para los humanos, o no puede escalarse su producción de forma económica, o no tiene una vida de anaquel suficientemente amplia (i.e. 2 años). Además, debe ser capaz de convencer a los agricultores en términos de sus beneficios-costos con respecto a los agroquímicos convencionales.

En relación a que “...representaría una alternativa agroecológica para el control de “WW” en la región “FF”, ya que se trata de una cepa nativa que puede tener mayores posibilidades de adaptabilidad y éxito en comparación con las cepas disponibles actualmente de manera comercial”, hay que mencionar que, además de los requisitos técnico-biológicos, uno de los mayores cuellos de botella en la comercialización de un ACB es el alto costo que representa el proceso de registro ante las autoridades agrícolas pertinentes y de salud (como COFEPRIS), de cada país donde se pretenda vender de manera legal el producto. Este proceso de registro incluye la demostración, por terceros certificados, de la inocuidad del producto y de la efectividad contra un fitopatógeno en un cultivo en particular. Esto último, es en sí mismo otro problema desde el punto de vista comercial ya que se deben hacer pruebas de efectividad biológica para cada binomio fitopatógeno-cultivo para lograr el registro correspondiente. El éxito comercial de los productos biológicos disponibles en el mercado está basado, en gran medida, en su amplio espectro antagonista. No hay un producto comercial que subsista en el mercado con un registro único fitopatógeno-cultivo y/o para una zona agrícola en particular, como asume la mayoría de la bibliografía científica. Es evidente que los costos de obtención de registros representan uno de los factores más relevantes en la puesta en el mercado de este tipo de productos.

El trabajo básico de fitopatología, incluyendo el conocimiento de las complejas interacciones

The basic phytopathology work, including the knowledge of the complex interactions of an BCA with biotic and/or abiotic factors of the agroecosystem (as pointed out by Córdova-Albores *et al.*, 2021) is crucial for the development of new biological control agents. However, if it is expected to benefit farmers in the management of diseases, it is essential to think and act in a multidisciplinary manner. I consider that the article by Köhl *et al.* (2011) should be mandatory reading for any phytopathologist, microbiologist or biotechnologist who wishes their work to become an effective reality for farmers. Likewise, I would recommend that phytopathologists read biotechnology papers, biotechnologists read phytopathology papers, and that both read about technological innovation. If we want our investigations to have a true social impact, we must not only strive for excellence in our specialized field, but also engage with researchers from other disciplines, who speak other languages and help us see beyond the relatively limited monodisciplinary horizon.

We are more used to the fact that innovations (i.e., discoveries introduced in the market, which is the only way to fulfill their social function of generating wealth) come from abroad. Most of the inputs purchased by Mexican farmers are produced using technology developed outside of Mexico's borders. In the field of biological control of phytopathogens, this is also the case, with only a few exceptions (Galindo *et al.*, 2013). Worldwide, biological control agents have been estimated to constitute only about 5% of the value of the crop protection industry market (this includes insect control, mainly using *B. thuringensis* toxins) (Lahlali *et al.*, 2022). However, due to regulatory pressure and the consumer preference for safer products, the biological control market (particularly for the control of phytopathogens, which is the least developed), is expected to grow significantly.

de los ACB con factores bióticos y/o abióticos en el agroecosistema (como lo han señalado Córdova-Albores *et al.*, 2021) es indispensable para el desarrollo de nuevos agentes de control biológico. Sin embargo, si se pretende que éste pueda generar beneficios a los agricultores en el manejo de enfermedades, es indispensable que se piense y se actúe de una forma multidisciplinaria. Considero que el artículo de Köhl *et al.* (2011) debiera ser una lectura obligada para cualquier fitopatólogo, microbiólogo o biotecnólogo, que quiera que su trabajo eventualmente llegue a una realidad efectiva para los agricultores. Asimismo, recomendaría a los fitopatólogos que lean artículos de biotecnología; a los biotecnólogos que lean artículos de fitopatología y a ambos, lecturas sobre innovación tecnológica. Si queremos que nuestras investigaciones tengan un verdadero impacto social, no debemos solo aspirar a lograr la excelencia en nuestro campo de especialidad, sino debemos involucrarnos con investigadores de otras disciplinas, que hablen otros lenguajes y que nos permitan ver más allá del relativamente limitado horizonte monodisciplinario.

Estamos más bien acostumbrados a que las innovaciones (esto es, los descubrimientos llevados al mercado, que es la única forma de cumplir su función social de generar riqueza) provengan del extranjero. La mayoría de los insumos que los agricultores mexicanos compran, son fabricados con tecnología desarrollada fuera de México. En el campo del control biológico de fitopatógenos, este también es el caso, con algunas pocas excepciones (Galindo *et al.*, 2013). A nivel mundial, se ha estimado que los agentes de control biológico constituyen sólo cerca del 5% del valor del mercado de la industria de protección de cultivos (y eso incluye el control de insectos, principalmente usando toxinas de *B. thuringensis*) (Lahlali *et al.*, 2022). Sin embargo, dada la presión

Therefore, in Mexico, we have an extraordinary opportunity, as we have the main ingredient, which is human talent. However, without a multidisciplinary perspective, this talent will hardly ensure that science and technology in this field will reach consumers. Thus, we must continue having excellence in the research in phytopathology and biotechnology, though in different ways and with significant social commitment. One of these ways is scientific entrepreneurship. If there are no companies interested in our developments, then let's create such companies. The story of a Mexican case has been published in the literature (Galindo *et al.*, 2013), describing how an investigation that began with the isolation of microorganisms antagonistic to *Colletotrichum gloeosporioides* ended in the launching of a commercial product now registered to control six diseases caused by fungi in approximately 25 crops.

In countries that have achieved spectacular economic growth in recent decades, such as South Korea and Israel, entrepreneurship is one of the most successful forms of technology transfer. Of course, scientific entrepreneurship is not for all researchers, although for recent Ph.D. graduates it can be a real career alternative, given the limited amount of highly qualified jobs currently available. However, for those who decide to take this path, I assure you it will not be easy, but definitely will be very rewarding. To be able to witness that a technological development which began in our laboratories is solving specific problems to the farmers is, with no doubt, one of the greatest professional rewards that one can have as a researcher.

LITERATURE CITED

Córdova-Albores LC, Zelaya-Molina LX, Ávila-Alistac N, Valenzuela-Ruiz V, Cortés-Martínez NE, Parra-Cota FI,

regulatoria y la predilección del consumidor por productos inocuos, se anticipa que el mercado del control biológico (sobre todo el de fitopatógenos, que es el menos desarrollado), crecerá de forma importante. Por ello, en México estamos ante una oportunidad extraordinaria, dado que contamos con el ingrediente principal que es el talento humano, el cual; sin embargo, sin una perspectiva multidisciplinaria, difícilmente podrá lograr que la ciencia y la tecnología en esta área llegue a los consumidores. Así, debemos continuar con la investigación de excelencia en fitopatología y en biotecnología, pero de una forma diferente y con un compromiso social significativo. Una de las formas es el emprendimiento científico. Si no hay empresas que estén interesadas en nuestros desarrollos, entonces, formemos esas empresas. La historia de un caso mexicano ha sido publicada en la literatura (Galindo *et al.*, 2013), en el que se relata cómo una investigación que inició con el aislamiento de microorganismos antagonistas de *Colletotrichum gloeosporioides*, culminó en el lanzamiento de un producto comercial que ahora tiene registro para controlar seis enfermedades causadas por hongos en aproximadamente 25 cultivos.

En países que han logrado crecimientos económicos espectaculares en las últimas décadas, como Corea del Sur e Israel, el emprendimiento es una de las formas más exitosas de transferencia tecnológica. Desde luego, el emprendimiento científico no es algo para todos los investigadores, aunque para los recién graduados de doctorado puede ser una real alternativa laboral ante la limitada oferta actual de empleos altamente calificados. Sin embargo, para aquellos que decidan tomar este camino, les aseguro que no será fácil, pero sí muy satisfactorio. Poder ver que un desarrollo que se inició en nuestros laboratorios, esté resolviendo problemas concretos a los agricultores, es sin duda una de las satisfacciones profesionales más grandes que uno puede tener como investigador.

- Burgos-Canul YY, Chávez-Díaz IF, Fajardo-Franco ML and de los Santos-Villalobos S. 2021. Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(1): 147-184. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-3>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Allende R, Balderas K, Patiño M, Trejo M, Wong MA, Rayo E, Isauro D and Jurado C. 2013. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: a case study. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(6). <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>
- Köhl J, Postma J, Nicot P, Ruocco M and Blum B. 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control* 57:1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.12.004>
- Lahlali R, Ezrari S, Radouane N, Kenfaoui J, Esmael Q, El Hamss H, Belabess Z and Barka EA. 2022. Biological control of plant pathogens: a global perspective. *Microorganisms* 10: 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Serrano-Carreón L y Rincón-Enríquez G. (Editores). 2021. Agentes de control biológico. *Biotecnología en Movimiento* 24. <https://biotecmov.ibt.unam.mx/numeros/24/>

Identification of species and physiological races of *Xanthomonas* isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) and chili pepper (*Capsicum annuum*) in Sinaloa, Mexico

Identificación de especies y razas fisiológicas de *Xanthomonas* aisladas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*) en Sinaloa, México

Laura Belén Tapia-de la Barrera, Manuel Alonzo Báez-Sañudo, Raymundo Saúl García-Estrada, Juan Manuel Tovar-Pedraza, José Armando Carrillo-Fasio*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, Carretera a ElDorado km 5.5, Culiacán, Sinaloa, CP 80110, México.

*Corresponding autor: acarrillo@ciad.mx

Received: October 29, 2022.

Accepted: May 12, 2023.

Tapia-de la Barrera LB, Báez-Sañudo MA, García-Estrada S, Tovar-Pedraza JM and Carrillo-Fasio JA. 2023. Identification of species and physiological races of *Xanthomonas* isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) and chili pepper (*Capsicum annuum*) in Sinaloa, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 326-342.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-2>

First DOI publication: June 04, 2023.

Primera publicación DOI: 04 de Junio, 2023.

Abstract. Bacterial spot of tomato and chili pepper, caused by four species of *Xanthomonas* and various races, is one of the diseases with the greatest impact on horticulture worldwide. The aim of this study was to identify the species and physiological races of *Xanthomonas* present in tomato (*Solanum*

Resumen. La mancha bacteriana del jitomate y chile, causada por cuatro especies de *Xanthomonas* y diversas razas, es una de las enfermedades de mayor impacto en la horticultura a nivel mundial. El objetivo de este estudio fue identificar a las especies y razas fisiológicas de *Xanthomonas* spp. presentes en los cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*) en Sinaloa, México. Para ello, se recolectaron muestras con síntomas de mancha bacteriana en campos comerciales tanto de jitomate como de chile, distribuidos en diferentes municipios de Sinaloa. Noventa y tres bacterias se aislaron en los medios agar nutritivo (AN) y agar levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC). Un total de 47 aislados bacterianos se identificaron como *Xanthomonas* mediante la combinación de pruebas morfológicas, patogénicas, bioquímicas, fisiológicas y moleculares. Además, para la caracterización de razas fisiológicas de cada una de las

lycopersicum) and chili pepper (*Capsicum annuum*) crops in Sinaloa, Mexico. For this purpose, samples with typical symptoms of bacterial spot were collected in commercial fields of the different municipalities in the state of Sinaloa. Ninety-three bacteria were isolated on semi-selective medium as nutrient agar and yeast extract-dextrose. A total of 47 bacteria were identified as *Xanthomonas* by a combination of morphological, pathogenic, biochemical, physiological, and molecular tests. In addition, to characterize the morphological race of each strain, differential tomato (four) and chili pepper (six) lines were used. Molecular diagnostic using specific primers indicated that 83% corresponded to *X. euvesicatoria*, 10.6% to *X. perforans*, and 6.4% to *X. vesicatoria*. At the physiological race level, races T1, T2, T3, and T5 were detected in tomato; while the *Xanthomonas* races detected in chili pepper were P0, P3, P6, P8 and P10. This information updates previous data on the distribution of races of *Xanthomonas* that infect chili peppers in Sinaloa, since races P6 and P10 are reported for the first time.

Keywords: Bacterial spot, differential lines, hypersensitivity reaction.

The bacterial spot in tomato (*S. lycopersicum*) and chili pepper (*C. annuum*) caused by *Xanthomonas* spp. is one of the most important and destructive diseases for these crops worldwide (Potnis *et al.*, 2015; Sharma and Bhattarai, 2019; Bogatzevska *et al.*, 2021; Rotondo *et al.*, 2022). Despite this disease being found in all the tomato and chili pepper producing regions, it is most severe in subtropical and tropical regions, where the pathogen is favored by high temperatures and constant rains (Koike *et al.*, 2007).

cepas, se utilizaron cuatro líneas diferenciales de jitomate y seis de chile. El análisis realizado mediante iniciadores específicos para su diagnóstico molecular confirmó que, el 83% correspondió a *X. euvesicatoria*, donde se detectaron las razas P0, P3, P6, y P10; el 10.6% a *X. perforans* con las razas fisiológicas T1, T2, T3 y T5, y el 6.4% a *X. vesicatoria*, detectándose las razas T1, T3 y T5. Entretanto, con las líneas diferenciales de jitomate se detectaron a las razas T1, T2, T3 y T5; mientras que con las líneas diferenciales de chile se detectaron las razas P0, P3, P6, P8 y P10. Esta información actualiza los datos previos sobre la distribución de razas de *Xanthomonas* que infectan al chile en Sinaloa, debido a que se reporta por primera vez a las razas P6 y P10.

Palabras clave: mancha bacteriana, líneas diferenciales, reacción de hipersensibilidad.

La mancha bacteriana en jitomate (*S. lycopersicum*) y chile (*C. annuum*) causada por *Xanthomonas* spp. es una de las enfermedades más importantes y destructivas en estos cultivos a nivel mundial (Potnis *et al.*, 2015; Sharma y Bhattarai, 2019; Bogatzevska *et al.*, 2021; Rotondo *et al.*, 2022). Aunque esta enfermedad ocurre en todas las regiones productoras de jitomate y chile, es más severa en regiones subtropicales y tropicales donde el patógeno es favorecido por la alta temperatura y lluvias constantes (Koike *et al.*, 2007).

Los síntomas foliares iniciales causados por *Xanthomonas* spp. consisten en manchas irregulares acuosas que posteriormente se tornan de color marrón oscuro a negro y por lo general miden <5 mm de diámetro. A medida que avanza la enfermedad, las manchas pueden coalescer y dar lugar a áreas necróticas grandes en las hojas. En infecciones avanzadas y severas, las plantas pueden deshojarse,

The initial foliar symptoms caused by *Xanthomonas* spp. consist of irregular aqueous spots that later turn dark maroon to black and generally measure <5 mm in diameter. As the disease progresses, the spots may coalesce and give way to large necrotic areas on the leaves. In advanced and severe infections, plants may lose leaves, particularly in their lower section. Infections of the fruits are irregular, rough, elevated brown scabs that measure 2–5 mm in diameter. The spots on the fruits are grouped near the end of the peduncle (Koike *et al.*, 2007).

Worldwide there are four species of *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri*) commonly associated to the disease known as bacterial spot in tomato and chili pepper (Jones *et al.*, 2004). To date, five *Xanthomonas* spp. races have been reported for tomato: race T1 reported in *X. euvesicatoria*, race T2 in *X. vesicatoria* and *X. gardneri*, races T3 and T4 reported in *X. perforans*, as well as race T5, which was reported as a recombination between races T3 and T4 of *X. perforans* (Adhikari *et al.*, 2020; Jibrin *et al.*, 2022). Meanwhile, in the case of chili pepper, 11 races have been reported (P0, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 and P10). The determination of the races in the *Xanthomonas* spp. strains is based on the hypersensitivity reaction in response to the effector proteins mediated through the type III secretion system in the host cells and with recognition from specific resistance proteins in differential tomato and chili pepper plants (Stall *et al.*, 2009).

For tomato, there are earlier studies that determined the diversity of races and/or species of *Xanthomonas* in strains gathered in the U.S.A. (Bouzar *et al.*, 1994; Rotondo *et al.*, 2022), India, Argentina, Spain, New Zealand, France, Hungary (Bouzar *et al.*, 1994), Taiwan (Hartman and Yang, 1990; Bouzar *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 2010),

especialmente en la parte inferior. Las infecciones en la fruta se observan de manera irregular como costras ásperas, levantadas, de color marrón, que miden de 2–5 mm de diámetro. Las manchas en los frutos se agrupan cerca del extremo del pedúnculo (Koike *et al.*, 2007).

A nivel mundial existen cuatro especies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri*) asociadas comúnmente a la enfermedad conocida como mancha bacteriana en jitomate y chile (Jones *et al.*, 2004). Actualmente, se reportan cinco razas de *Xanthomonas* spp. para jitomate: raza T1 reportada en *X. euvesicatoria*, raza T2 en *X. vesicatoria* y *X. gardneri*, razas T3 y T4 reportadas en *X. perforans*; así como, la raza T5, la cual se reportó como una recombinación entre la raza T3 y T4 de *X. perforans* (Adhikari *et al.*, 2020; Jibrin *et al.*, 2022). Mientras que, en el caso de chile, se han reportado 11 razas (P0, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 y P10). La determinación de las razas en las cepas de *Xanthomonas* spp. se basa en la reacción de hipersensibilidad en respuesta a las proteínas efectoras mediadas a través del sistema de secreción tipo III en las células del hospedante y con reconocimiento por proteínas de resistencia específicas en plantas diferenciales de jitomate y chile (Stall *et al.*, 2009).

En jitomate, existen estudios previos donde se determinó la diversidad de razas y/o especies de *Xanthomonas* en cepas colectadas en EE. UU. (Bouzar *et al.*, 1994; Rotondo *et al.*, 2022), India, Argentina, España, Nueva Zelanda, Francia, Hungría (Bouzar *et al.*, 1994), Taiwán (Hartman y Yang, 1990; Bouzar *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 2010), México (Bouzar *et al.*, 1994; Bouzar *et al.*, 1996), Islas del Caribe (O'Garro, 1998), Brasil (Bouzar *et al.*, 1994; Quezado-Duval y Camargo, 2004), Canadá (Bouzar *et al.*, 1994; Abbasi *et al.*, 2015), Australia (Bouzar *et al.*, 1994; Roach *et al.*, 2018), Tailandia (Sitthitanasin *et al.*, 2020), Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021) y África (Jibrin *et al.*, 2022).

Mexico (Bouzar *et al.*, 1994; Bouzar *et al.*, 1996), Caribbean Islands (O'Garro, 1998), Brazil (Bouzar *et al.*, 1994; Quezado-Duval and Camargo, 2004), Canada (Bouzar *et al.*, 1994; Abbasi *et al.*, 2015), Australia (Bouzar *et al.*, 1994; Roach *et al.*, 2018), Thailand (Sitthitanasin *et al.*, 2020), Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021) and Africa (Jibrin *et al.*, 2022).

For chili pepper, *Xanthomonas* races and species have been identified with strains from Argentina, Brazil, Hungary, Senegal, Spain, Tongo (Bouzar *et al.*, 1994), U.S.A. (Bouzar *et al.*, 1994; Kousik and Ritchie 1995; Rotondo *et al.*, 2022), Taiwan (Hartman and Yang, 1990; Bouzar *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 2010), Mexico (Bouzar *et al.*, 1994; 1996; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001), Caribbean Islands (Bouzar *et al.*, 1994; O'Garro, 1998), Australia (Bouzar *et al.*, 1994; Roach *et al.*, 2018), Thailand (Sitthitanasin *et al.*, 2020), Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021) and Africa (Jibrin *et al.*, 2022).

In Sinaloa, the main tomato and chili pepper producing state in Mexico, the bacterial spot is widely distributed and it continuously appears as an epidemic, causing important losses in the production of both crops (Carrillo-Fasio *et al.*, 2001). In this sense, some previous studies of the diversity of *Xanthomonas* races in these crops were based on strains isolated from fields in Sinaloa and Sonora (Bouzar *et al.*, 1994; 1996; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001). Nevertheless, the information of the distribution and presence of *Xanthomonas* spp. races in the tomato and chili pepper crops must be updated, based on studies complemented with molecular data. Therefore, the aim of this study was to identify the races and species of *Xanthomonas* that infect tomato and chili pepper crops in the state of Sinaloa, Mexico with the combination of morphological, pathogenic, biochemical, physiological and molecular tests.

Para el cultivo de chile se han identificado razas y/o especies de *Xanthomonas* con cepas provenientes de Argentina, Brasil, Hungría, Senegal, España, Tongo (Bouzar *et al.*, 1994), EE. UU. (Bouzar *et al.*, 1994; Kousik y Ritchie 1995; Rotondo *et al.*, 2022), Taiwán (Hartman y Yang, 1990; Bouzar *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 2010), México (Bouzar *et al.*, 1994; 1996; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001), Islas del Caribe (Bouzar *et al.*, 1994; O'Garro, 1998), Australia (Bouzar *et al.*, 1994; Roach *et al.*, 2018), Tailandia (Sitthitanasin *et al.*, 2020), Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021) y África (Jibrin *et al.*, 2022).

En Sinaloa, principal estado productor de jitomate y chile en México, la mancha bacteriana presenta una amplia distribución y se observa continuamente en forma epidémica, ocasionando pérdidas importantes en la producción de ambos cultivos (Carrillo-Fasio *et al.*, 2001). En este sentido, algunos estudios previos que estudiaron la diversidad de razas de *Xanthomonas* en estos cultivos, se basaron en cepas aisladas de campos de Sinaloa y Sonora (Bouzar *et al.*, 1994; 1996; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001). No obstante, la información de la distribución y presencia de razas de *Xanthomonas* spp. en los cultivos de jitomate y chile debe actualizarse con base en estudios complementados con datos moleculares. Por lo que, el objetivo de este estudio fue identificar a las razas y especies de *Xanthomonas* que infectan a los cultivos de jitomate y chile en el estado de Sinaloa, México mediante la combinación de pruebas morfológicas, patogénicas, bioquímicas, fisiológicas y moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras. Durante octubre de 2016 a marzo de 2017, se recolectaron hojas de jitomate y chile con síntomas típicos de mancha

MATERIALS AND METHODS

Samples collection. Between October, 2016 and March, 2017, leaves were taken from tomato and chili pepper plants with typical symptoms of bacterial spot in 47 commercial fields distributed among the municipal areas of Ahome (8), Guasave (7), Navolato (7), Culiacán (9), Elota (5) and Escuinapa (11), in Sinaloa, Mexico. The crops were found in different stages of development, from the initial stage to the stage of production.

Isolation of bacteria. The leaves gathered were disinfested superficially in 70% alcohol for 30 seconds, cut into small pieces from the edges of the lesions and ground in sterile distilled water. The suspension was planted in grooves on Petri dishes with a nutrient agar (NA) culture and a yeast-dextrose-calcium carbonate (YDC) medium. The dishes were incubated at 28 °C for 48 h in constant darkness, and the round, convex, yellow cultures with a mucous-like consistency were then selected and purified. Pure cultures were kept in tubes with water at 4 °C for short-term storage, and in 20% glycerin at -20 °C for their long-term storage (Schaad *et al.*, 2001).

Hypersensitivity reaction. In order to verify that the isolated strains were pathogenic, a hypersensitivity test was carried out using two-month-old tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). A bacterial solution was prepared with a concentration of 3×10^8 UFC mL⁻¹ according to McFarland's scale (Kyrály *et al.*, 1974); using a hypodermic needle, the solution was infiltrated into the reverse side of the leaf, identifying each infiltrated area with the data or the register of the strain. The plants were placed in greenhouse conditions and monitored for the first 48 h (Király *et al.*, 1974). The strains that induced a positive hypersensitivity reaction were chosen for further studies.

bacteriana en 47 campos comerciales distribuidos los municipios de Ahome (8), Guasave (7), Navolato (7), Culiacán (9), Elota (5) y Escuinapa (11), en Sinaloa, México. Los cultivos se encontraban en diversas etapas de desarrollo; desde la etapa inicial hasta la etapa de producción.

Aislamiento de bacterias. Las hojas colectadas se desinfectaron superficialmente en alcohol al 70% por 30 segundos, se cortaron en pequeños trozos a partir de los márgenes de la lesión y se trituraron en agua destilada estéril. La suspensión se sembró por estrías sobre placas Petri con medio de cultivo Agar nutritivo (AN) y medio de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC) Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h en oscuridad continua, y posteriormente se seleccionaron y purificaron las colonias redondas, convexas, amarillas y de consistencia mucosa. Los cultivos puros se conservaron en tubos con agua a 4 °C para su almacenamiento a corto plazo y en glicerina al 20% a temperatura de -20 °C para su almacenamiento a largo plazo (Schaad *et al.*, 2001).

Reacción de hipersensibilidad. Con el fin de corroborar que las cepas aisladas fueran patógenas, se realizó la prueba de hipersensibilidad, utilizando plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de dos meses de edad. Se preparó una solución bacteriana con una concentración de 3×10^8 UFC mL⁻¹ según la escala de McFarland's (Kyrály *et al.*, 1974) y con una jeringa hipodérmica se infiltró la solución en el envés de la hoja, identificando cada área infiltrada con el dato o registro de la cepa. Las plantas se colocaron en condiciones de invernadero y se monitorearon durante las primeras 48 h (Király *et al.*, 1974). Aquellas cepas que indujeron una reacción de hipersensibilidad positiva fueron las que se seleccionaron para continuar con su estudio.

Biochemical and physiological tests. Out of the 93 isolated strains, only 47 (39 for tomato and 8 for chili pepper) displayed the phenotypical characteristics reported for *Xanthomonas* spp., and with these, the biochemical and physiological tests (Gram stain, oxidative/fermentative metabolism of carbohydrates, oxidase and starch) described by Schaad *et al.* (2001) were performed. All tests were carried out three times.

DNA extraction and amplification by PCR.

Bacterial cell lysis was carried out by thermal shock from young cultures, planted for 2 days in YDC medium. To do this, a pure culture was placed in a 1.5 mL microcentrifuge tube with 100 µL of injectable water and the solution was homogenized. It was then placed for 15 min at 95 °C in a thermoblock (Labnet) and immediately transferred to a container with ice for 7 min. Once the time was over, it was centrifuged at 10 000 x g for 15 min, the supernatant was poured and the tablet was resuspended in 50 µL of injectable water.

The PCR amplification was carried out with 5 pairs of primers (Sigma) that flanked the *HrpB2* gene, specified in Table 1 (Obradovic *et al.*, 2004),

Pruebas bioquímicas y fisiológicas. De un total de 93 cepas aisladas, solo 47 (39 de jitomate y 8 de chile) presentaron las características fenotípicas reportadas para *Xanthomonas* spp., y con estas se realizaron las pruebas bioquímicas y fisiológicas (tinción de Gram, metabolismo oxidativo/fermentativo de los carbohidratos, oxidasa y almidón) descritas por Schaad *et al.* (2001). Todas las pruebas se realizaron en tres ocasiones.

Extracción de ADN y amplificación por PCR.

La lisis celular de la bacteria se realizó por medio de choque térmico a partir de colonias jóvenes cultivadas por dos días en medio YDC. Para ello, se colocó una colonia pura en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, conteniendo 100 µL de agua inyectable y se homogenizó la solución. Posteriormente, se colocó durante 15 min a 95 °C en un termoblock (Labnet) y después se transfirió inmediatamente a un recipiente con hielo durante 7 min. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 10 000 x g por 15 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua inyectable.

La amplificación por PCR se llevó a cabo con cinco pares de iniciadores (Sigma) que flanquean al

Table 1. Specific primers for the identification of *Xanthomonas* species in strains obtained from tomato and chili pepper in Sinaloa, Mexico.

Cuadro 1. Iniciadores específicos para la identificación de especies de *Xanthomonas* en cepas obtenidas de jitomate y chile en Sinaloa, México.

Species	Primer name	Gene sequence	Amplicon (pb)
<i>Xanthomonas</i> spp.	RST 65	5'-GTCGTCGTTACGGCAAGGTGGTTCG-3'	420
	RST 69	3'-TCGCCCAGCGTCATCAGGCCATC-5'	
<i>X. euvesicatoria</i>	Bs-XeF	5'CATGAAGAACTCGGCGTATCG-3'	173
	Bs-XeR	3'-GTCGGACATAGTGGACACATAC-5'	
<i>X. vesicatoria</i>	Bs-XvF	5'-CCATGTGCCGTTGAAATACTTG-3'	138
	Bs-XvR	3'-ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC-5'	
<i>X. perforans</i>	Bs-XpF	5'-GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC-3'	197
	Bs-XpR	3'-GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG-5'	
<i>X. gardneri</i>	Bs-XgF	5'-TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC-3'	154
	Bs-XgR	3'-TGACCGATAAAGACTGCGAAAG-5'	

and a reaction mixture shown in Table 2. The reagents were from the kit GoTaq® PCR Core System I. The amplification conditions were: an initial denaturalization at 95 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 1 min, 56 °C for 1 min, 75 °C for 1 min; and a final extension at 75 °C for 10 min. The reactions took place in a Proflex PCR system thermocycler (Applied Biosystem).

Amplicons were observed via electrophoresis in 1% agarose gel using an electrophoresis chamber

gen *HrpB2*, especificados en el Cuadro 1 (Obradovic *et al.*, 2004), y una mezcla de reacción indicada en el Cuadro 2. Los reactivos pertenecen al kit GoTaq® PCR Core System I. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 75 °C por 1 min; y una extensión final a 75 °C por 10 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Proflex PCR system (Applied Biosystem).

Table 2. Reaction mixture for PCR for the identification of *Xanthomonas* species.
Cuadro 2. Mezcla de reacción para la PCR para la identificación de especies de *Xanthomonas*.

Reactive (Initial concentration)	Final Volume (µL)	Final Concentration
Buffer (10X)	2.5	1 X
MgCl ₂ (50mm)	1.2	2.5 mM
Taq Pol (5 u/mL)	0.125	0.25 U
Primer RST65 (10 mM)	1.25	0.5 mM
Primer RST 69 (10 mM)	1.25	0.5 mM
Primer Bs-XeF (10 mM)	0.5	0.2 mM
Primer Bs-XeR (10 mM)	0.5	0.2 mM
Primer Bs-XvF (10 mM)	1.0	0.4 mM
Primer Bs-XvR (10 mM)	1.0	0.4 mM
Primer Bs-XpF (10 mM)	0.75	0.3 mM
Primer Bs-XpR (10 mM)	0.75	0.3 mM
Bs-XgF (10 mM)	0.75	0.3 mM
Bs-XgR (10 mM)	0.75	0.3 mM
DNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
DNA	1	
H ₂ O cbp	Gauge to 25	

MgCl₂: Magnesium chloride, Taq Pol: polymerase DNA, dNTPs: deoxynucleotide triphosphate, Sense primer for genus *Xanthomonas*: RST65, antisense primer for genus *Xanthomonas*: RST 69, sense primer for *X. euvesicatoria*: Bs-XeF, antisense primer for *X. euvesicatoria*: Bs-XvR, sense primer for *X. vesicatoria*: Bs-XeF, antisense primer for *X. euvesicatoria*: Bs-XeR, sense primer for *X. perforans*: Bs-XpF, antisense primer for *X. perforans*: Bs-XpR; sense primer for *X. gardneri*: Bs-XgF, antisense primer for *X. gardneri*: Bs-XgR. / MgCl₂: Cloruro de Magnesio, Taq Pol: ADN polimerasa, dNTPs: deoxinucleótidos trifosfato, Iniciador sentido para género *Xanthomonas*: RST65, iniciador antisentido para género *Xanthomonas*: RST 69, iniciador sentido para *X. euvesicatoria*: Bs-XeF, iniciador antisentido para *X. euvesicatoria*: Bs-XvR, iniciador sentido para *X. vesicatoria*: Bs-XeF, iniciador antisentido para *X. euvesicatoria*: Bs-XeR, iniciador sentido para *X. perforans*: Bs-XpF, iniciador antisentido para *X. perforans*: Bs-XpR; iniciador sentido para *X. gardneri*: Bs-XgF, iniciador antisentido para *X. gardneri*: Bs-XgR.

(BioRad) and 60 V were run through them for 50 min. Later, the gels were viewed in a transilluminator (Benchtop) with UV light.

Physiological races of *Xanthomonas* in chili pepper.

The physiological races of *Xanthomonas* spp. were determined using the chili pepper material cv. Early California Wonder (susceptible) and a set of isogenic lines derived from Early California wonder (ECW), including ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R, PT235047 and ECWPLUS. Lines ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R contain resistance genes 10R, 20R and 30R from *Capsicum pubescens*, respectively; whereas line ECWPLUS contains genes 10R, 20R, 30R, 50R and 60R (Table 3).

The plants were cultivated in a greenhouse under conditions of controlled relative humidity (60–70%) and temperature (25 °C) for 60 days. Next came infiltration, which was carried out with a 3×10^8 UFC mL⁻¹ bacterial solution, using a 5 mL syringe without a needle, taking care that the infiltration covered a great part of the area of the

Los amplicones se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa a 1% usando una cámara de electroforesis (BioRad) y se sometieron a 60 V durante 50 min. Posteriormente, los geles se visualizaron en un transiluminador (Benchtop) con luz UV.

Razas fisiológicas de *Xanthomonas* en Chile.

Las razas fisiológicas de *Xanthomonas* spp. se determinaron utilizando el material de Chile cv. Early California Wonder (susceptible) y un conjunto de líneas isogénicas derivadas de Early California wonder (ECW), incluyendo a ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R, PT235047 y ECWPLUS. Las líneas ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R contienen los genes de resistencia 10R, 20R y 30R de *Capsicum pubescens*, respectivamente; mientras que la línea ECWPLUS tiene los genes 10R, 20R, 30R, 50R y 60R (Cuadro 3).

Las plantas se cultivaron en invernadero bajo condiciones de humedad relativa (60–70%) y temperatura (25 °C) controladas durante 60 días. Posteriormente, se llevó a cabo la infiltración, la cual

Table 3. Classification of *Xanthomonas* spp. races in chili pepper (*Capsicum annuum*) by susceptibility and hypersensitivity reactions.

Cuadro 3. Clasificación de razas de *Xanthomonas* spp. en Chile (*Capsicum annuum*) por reacciones de susceptibilidad e hipersensibilidad.

ECW	ECW10	ECW20	ECW30	CP	ECW-12356	RACE
S	HR	HR	HR	HR	HR	0
S	S	HR	HR	HR	HR	1
S	HR	HR	S	S	HR	2
S	S	HR	S	HR	HR	3
S	S	S	HR	HR	HR	4
S	HR	S	S	S	HR	5
S	S	S	S	HR	R	6
S	S	HR	HR	S	HR	7
S	S	HR	S	S	HR	8
S	S	S	HR	S	HR	9
S	S	S	S	S	R	10

S= Susceptible.; HR= Hypersensitivity reaction. / S= Susceptible.; HR= Reacción de hipersensibilidad.

leaf. A group of differential plants, inoculated with distilled water, served as a control. The plants were evaluated after 48 h and after a week after inoculation to determine the reactions of hypersensitivity (RH) and susceptibility (S). The test considered RH when dark brown spots were observed. In the exclusive case of line ECWPLUS, an RH was considered as a dry yellowish spot, whereas an S reaction was considered when the leaf displayed flaccidity and wateriness. The results were checked against the information presented in Table 3 (Stall *et al.*, 2009).

Physiological races of *Xanthomonas* in tomato.

To identify the physiological races of *Xanthomonas* spp. strains in tomato, differential lines Hawaii7998, Hawaii7891, PI114490 and LA716 (Table 4) were used, with the same methodology mentioned earlier for chili pepper. The plants were evaluated after 48 h and one week after inoculation, the reactions of hypersensitivity (RH) and susceptibility (S) were recorded. The test was considered as RH when dry and dark brown spots appeared, whereas a reaction was considered S when the leaf displayed flaccidity and wateriness. The results were checked against the information presented in Table 4 (Stall *et al.*, 2009).

se realizó con una solución bacteriana de 3×10^8 UFC mL⁻¹ usando una jeringa de 5 mL sin aguja, teniendo cuidado que la infiltración abarcara gran parte del área de la hoja. Un grupo de plantas diferenciales inoculadas con agua destilada, sirvieron como control. Las plantas se evaluaron a las 48 h y a la semana después de inoculación para determinar las reacciones de hipersensibilidad (RH) y de susceptibilidad (S). En la prueba se consideró RH cuando se observaron manchas color café oscuro. En el caso exclusivo de la línea ECWPLUS, una RH se consideró como una mancha amarillenta seca; mientras que, se consideró una reacción S cuando en la hoja se observó flacidez y acuosidad. Los resultados se cotejaron con la información del Cuadro 3 (Stall *et al.*, 2009).

Razas fisiológicas de *Xanthomonas* en jitomate.

Para la identificación de razas fisiológicas de las cepas de *Xanthomonas* spp. en jitomate, se utilizaron las líneas diferenciales Hawaii7998, Hawaii7891, PI114490 y LA716 (Cuadro 4). Utilizando la misma metodología mencionada anteriormente para chile. Las plantas se evaluaron a las 48 h y a la semana después de inoculación se registraron las reacciones de hipersensibilidad (RH) y de susceptibilidad (S). La prueba se consideró como RH al ob-

Table 4. Classification of physiological *Xanthomonas* races in tomato by susceptibility and hypersensitivity reactions.

Cuadro 4. Clasificación de razas fisiológicas de *Xanthomonas* en jitomate por reacciones de susceptibilidad e hipersensibilidad.

Race	Hawaii 7998	Hawaii7981	LA716	PI114490
T1	HR	S	S	R
T2	S	S	S	R
T3	S	HR	HR	R
T4	S	S	HR	R
T5	S	S	S	S

RESULTS AND DISCUSSION

The symptoms of bacterial spot were observed in the leaves of chili pepper and tomato plants when gathering the plant material in all the sites visited. The incidence of the disease was 5–10% and 15–25% in commercial fields with chili pepper and tomato, respectively.

The tests performed showed that, out of the 93 isolated strains, only 47 displayed the morphological characteristics of round, convex, yellow cultures with a mucous-like texture in a YDC medium, along with the fact that they were Gram and negative oxidase. These morphological and biochemical characteristics coincided with those reported by Schaad *et al.* (2001) for the case of *Xanthomonas* spp. It is worth pointing out that 32 out of the 47 strains registered negative amylase.

Likewise, out of the 93 isolated strains, only 47 induced RH in tobacco plants 24 h after inoculation, and based on the biochemical, physiological and pathogenicity tests, the 47 were confirmed to belong to the genus *Xanthomonas*.

The identification of three *Xanthomonas* spp. related to chili pepper and tomato was possible using the specific primers for each species (Table 5). All the endpoint PCR products were viewed in agarose gel, as in the example shown in Figure 1.

The molecular analysis in which specific primers were used confirmed that 83% of the *Xanthomonas* strains obtained from tomato and chili pepper plantations in Sinaloa (Table 5), corresponded to *X. euvesicatoria*; 10.6%, to *X. perforans* and 6.3%, to *X. vesicatoria*. Similarly, Lue *et al.* (2010) reported these three *Xanthomonas* species associated to tomato and chili pepper in Taiwan, who didn't find *X. gardneri* neither.

Earlier studies in Mexico reported *X. vesicatoria* as the predominant species in tomato and chili pepper fields in the states of Sinaloa (Bouzar *et*

servar manchas color café oscuro y secas, mientras que se consideró una reacción S cuando en la hoja se observó flacidez y acuosidad. Los resultados se cotejaron con la información del Cuadro 4 (Stall *et al.*, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de mancha bacteriana se observaron en las hojas de chile y jitomate al momento de recolección del material vegetal en todos los sitios que se visitaron. La incidencia de la enfermedad fue de 5–10% y de 15–25% en campos comerciales con chile y jitomate, respectivamente.

Las pruebas realizadas mostraron que, de las 93 cepas aisladas, solo 47, presentaron las características morfológicas de colonias redondas, convexas, amarillas y mucoides en medio YDC; además, de que fueron Gram y oxidasa negativas. Estas características morfológicas y bioquímicas coincidieron con las reportadas por Schaad *et al.* (2001) para el caso de *Xanthomonas* spp. Cabe resaltar que, 32 de las 47 cepas, registraron amilasa negativa.

Igualmente, de las 93 cepas aisladas, solo 47 indujeron RH en plantas de tabaco a las 24 h después de la inoculación y con base en las pruebas bioquímicas, fisiológicas y de patogenicidad, se confirmó que las 47 cepas bacterianas pertenecieron al género *Xanthomonas*.

Fue posible realizar la identificación de tres especies de *Xanthomonas* spp. relacionadas con chile y jitomate utilizando los iniciadores específicos para cada especie (Cuadro 5). Todos los productos de PCR punto final se visualizaron en un gel de agarosa como el ejemplo que se muestra en la Figura 1.

El análisis molecular donde se utilizaron iniciadores específicos confirmó que, el 83% de las 47 cepas de *Xanthomonas* obtenidas de campos de

Table 5. Species and races of *Xanthomonas* isolated from chili pepper and tomato from Sinaloa from November, 2016 to March, 2017.

Cuadro 5. Especies y razas de *Xanthomonas* aisladas de chile y jitomate en el estado de Sinaloa durante noviembre de 2016 a Marzo de 2017.

Strain	Municipality	Crop	HA	PCR	REA	Race P	Race T
1	Ahome	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	P0	T3
2	Culiacán	Jitomate	-	<i>X. v</i>	B	-	T3
3	Elota	Chile	-	<i>X. e</i>	A	P8	T1
4	Guasave	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
5	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. p</i>	C	-	T1
6	Navolato	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
7	Culiacán	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
8	Ahome	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
9	Guasave	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
10	Guasave	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T1
11	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
12	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
13	Culiacán	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
14	Ahome	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
15	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
16	Navolato	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T1
17	Ahome	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
18	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
19	Culiacán	Jitomate	-	<i>X. v</i>	B	-	T1
20	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
21	Guasave	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
22	Escuinapa	Chile	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
23	Ahome	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
24	Navolato	Jitomate	+	<i>X. p</i>	C	-	T1
25	Elota	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T1
26	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
27	Navolato	Chile	+	<i>X. e</i>	A	P0	-
28	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	P8	T3
29	Culiacán	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T2
30	Escuinapa	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T1
31	Guasave	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T1
32	Culiacán	Chile	+	<i>X. p</i>	C	P0	-
33	Elota	Chile	+	<i>X. p</i>	C	P3	T1
34	Ahome	Chile	+	<i>X. e</i>	A	P6	T1
35	Guasave	Chile	+	<i>X. p</i>	C	P10	T3
36	Navolato	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T3
37	Culiacán	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T3
38	Guasave	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	P8	T1
39	Navolato	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	P8	T1
40	Elota	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	P8	T1
41	Culiacán	Chile	-	<i>X. e</i>	A	-	-
42	Ahome	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T1
43	Navolato	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	P8	T3
44	Escuinapa	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T5
45	Ahome	Jitomate	-	<i>X. e</i>	A	-	T5
46	Elota	Jitomate	+	<i>X. e</i>	A	-	T5
47	Culiacán	Jitomate	-	<i>X. v</i>	B	-	T5

HA= Starch hydrolysis; **Raza P**= Chili pepper race; **Raza T**= Tomato race; *X. e.* = *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. v.* = *Xanthomonas vesicatoria*, *X. p.* = *Xanthomonas perforans*. / **HA**= Hidrólisis de Almidón; **Raza P**= Raza en Chile; **Raza T**= Raza en jitomate; *X. e.* = *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. v.* = *Xanthomonas vesicatoria*, *X. p.* = *Xanthomonas perforans*.

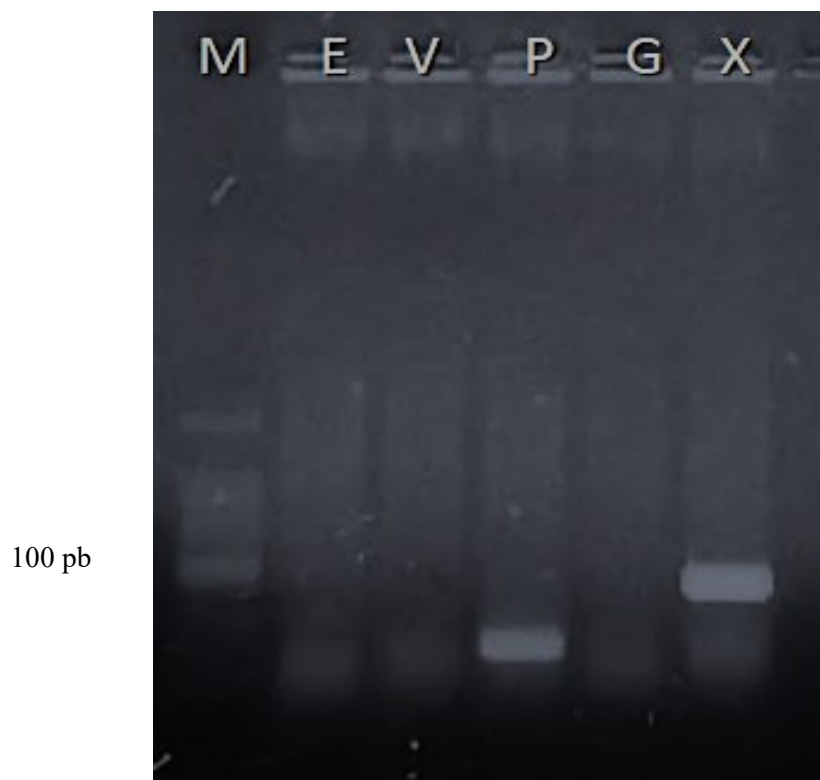


Figure 1. Agarose gel to detect *Xanthomonas* spp. species. In the first lane (M) 100 pb marker; in the second lane, primers for *X. euvesicatoria* (E); third, *X. vesicatoria* (V), fourth lane with a specific stripe for *X. perforans* (P); fifth, *X. gardneri* (G) and sixth lane with universal primers for *Xanthomonas* spp. (X).

Figura 1. Gel de agarosa para detección de especies de *Xanthomonas* spp. En el primer carril (M) marcador de 100 pb, segundo, iniciadores para *X. euvesicatoria* (E), tercero, *X. vesicatoria* (V), cuarto carril con banda específica para *X. perforans* (P), el quinto *X. gardneri* (G) y en sexto carril con iniciadores universales para *Xanthomonas* spp. (X).

al., 1996; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001) and Sonora (Bouzar *et al.*, 1996). This contrasted with our study, in which *X. euvesicatoria* was the most frequent species in fields in Sinaloa; whereas *X. perforans* and *X. vesicatoria* were the least frequent (Table 5). This variation can be explained by the continuous movement of contaminated seeds between countries (Abbasi *et al.*, 2015; Jibrin *et al.*, 2022).

For the case of the eight strains obtained from chili pepper plants in the state of Sinaloa, 62.5% corresponded to *X. euvesicatoria*. This coincided with studies carried out in Australia (Roach *et al.*, 2018), Thailand (Sitthithanasin *et al.*, 2020)

jitomate y chile en Sinaloa (Cuadro 5), correspondió a *X. euvesicatoria*, el 10.6% a *X. perforans* y el 6.3% a *X. vesicatoria*. De manera similar, Lue *et al.* (2010) reportaron a estas tres especies de *Xanthomonas* asociadas a jitomate y chile en Taiwán, y tampoco detectaron a *X. gardneri*.

En estudios previos en México, se reportó a *X. vesicatoria* como la especie predominante en campos con jitomate y chile en los estados de Sinaloa (Bouzar *et al.*, 1996; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001) y Sonora (Bouzar *et al.*, 1996). Esto contrastó con nuestro estudio en el cual, *X. euvesicatoria* fue la especie más frecuente en campos de Sinaloa; mientras que, *X. perforans* y *X. vesicatoria* fueron las

and Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021), where *X. euvesicatoria* was the predominant species in the chili pepper crop.

In this study, *X. euvesicatoria* was the most frequent species (87.1%) in the 39 strains analyzed from tomato fields in Sinaloa. Similarly, this species has been reported in tomato fields in Taiwan (Lue *et al.*, 2010), Canada (Abbasi *et al.*, 2015), Nigeria (Jibrin *et al.*, 2018), Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021) and the U.S. Midwest (Rotondo *et al.*, 2022).

Xanthomonas perforans was the second most common species in this study, with a frequency of 10.6% in tomato and chili pepper fields in Sinaloa. This species was previously found in tomato fields in Taiwan (Lue *et al.*, 2010), Canada (Abbasi *et al.*, 2015), Australia (Roach *et al.*, 2018), Thailand (Sitthitanasin *et al.*, 2020) and the U.S. Midwest (Rotondo *et al.*, 2022),

Xanthomonas vesicatoria was the least frequent species (6.4%) out of the strains isolated from tomato and chili pepper fields in Sinaloa, broadly coinciding with the study by Lue *et al.* (2010), who found this species less frequently and less distributed in tomato fields in Taiwan in comparison with *X. euvesicatoria* and *X. perforans*. On the other hand, Bogatzevska *et al.* (2021) pointed out that *X. vesicatoria* was the most frequent and widely distributed in the same crop in Bulgaria.

Out of the *X. euvesicatoria* strains isolated from chili pepper fields in Sinaloa, races P0, P3, P6, P8 and P10 were identified. Similarly, these races were also found in chili pepper fields in Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021), whereas for the strains isolated from tomato, six were found to be able to attack chili pepper plants, being races P0 and P8.

Comparing the earlier results obtained by Carrillo-Fasio *et al.* (2001), the study of *Xanthomonas* spp. races in Sinaloa showed that after more than 15 years, races P1 and P2 were not found in this study, probably due to their not being present in the sampled production areas, or that the

species menos frecuentes (Cuadro 5). Esta variación puede explicarse por el continuo movimiento de semilla contaminada entre países (Abbasi *et al.*, 2015; Jibrin *et al.*, 2022).

Para el caso de las ocho cepas obtenidas de plantas de chile en campos de Sinaloa, el 62.5% correspondió a *X. euvesicatoria*. Esto coincidió con estudios realizados en Australia (Roach *et al.*, 2018), Tailandia (Sitthitanasin *et al.*, 2020) y Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021), donde *X. euvesicatoria* fue la especie predominante en el cultivo de chile.

En este estudio, *X. euvesicatoria* fue la especie más frecuente (87.1%) en las 39 cepas analizadas de campos de jitomate en Sinaloa. Similarmente, esta especie se ha reportado en campos con jitomate en Taiwán (Lue *et al.*, 2010), Canadá (Abbasi *et al.*, 2015), Nigeria (Jibrin *et al.*, 2018), Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021) y medio oeste de los EE. UU. (Rotondo *et al.*, 2022).

Xanthomonas perforans fue la segunda especie más común en nuestro estudio con un 10.6% de frecuencia en campos con jitomate y chile en Sinaloa. Esta especie se detectó previamente en campos con jitomate en Taiwán (Lue *et al.*, 2010), Canadá (Abbasi *et al.*, 2015), Australia (Roach *et al.*, 2018), Tailandia (Sitthitanasin *et al.*, 2020) y medio oeste de los EE. UU. (Rotondo *et al.*, 2022),

Xanthomonas vesicatoria fue la especie menos frecuente (6.4%) de las cepas aisladas de campos con jitomate y chile en Sinaloa, coincidiendo ampliamente con el estudio de Lue *et al.* (2010), quienes encontraron a esta especie en menor frecuencia y menos distribuida en campos de jitomate en Taiwán en comparación con *X. euvesicatoria* y *X. perforans*. Por el contrario, Bogatzevska *et al.* (2021) señalaron que *X. vesicatoria* fue la especie más frecuente y ampliamente distribuida en el mismo cultivo, en Bulgaria.

De las cepas de *X. euvesicatoria* que se aislaron de campos con chile en Sinaloa, se identificaron las

sampling date did not coincide with the presence of the pathogen. Meanwhile, races P6 and P10 were detected for the first time, whereas races P0 and P3 continue in the population of *Xanthomonas* spp. The predominant races in Sinaloa were P0, P6 and P8, unlike the year 2001, in which the predominant race was P3.

In the tomato crop in the fields of Sinaloa, races T1, T2, T3 and T5 of *Xanthomonas* were detected. Based on strain distribution and frequency data, in northern Sinaloa (Ahome and Guasave) races T1 and T3 are found; in the center of the state (Culiacán, Navolato and Elota), races T1, T2 and T3 were found, and in the south (Escuinapa), races T1, T2, T3 and T5, being races T1 and T3 the most predominant in the entire state (Figure 2). In the

razas P0, P3, P6, P8 y P10. De manera similar, estas razas también se han detectado en campos con chile en Bulgaria (Bogatzevska *et al.*, 2021). Mientras que, de las cepas aisladas de jitomate, se encontraron que seis fueron capaces de atacar a plantas de chile siendo las razas P0 y P8.

Comparando con los resultados previos obtenidos por Carrillo-Fasio *et al.* (2001), en el estudio de razas de *Xanthomonas* spp. en Sinaloa, se observó que después de más de 15 años; las razas P1 y P2 no se encontraron en este estudio debido a probablemente a que no están presentes en las zonas de producción muestreadas o que la fecha de muestreo no coincidió con la presencia del patógeno. Entretanto, las razas P6 y P10 se detectaron por primera vez; mientras que, las razas P0 y P3 continúan en

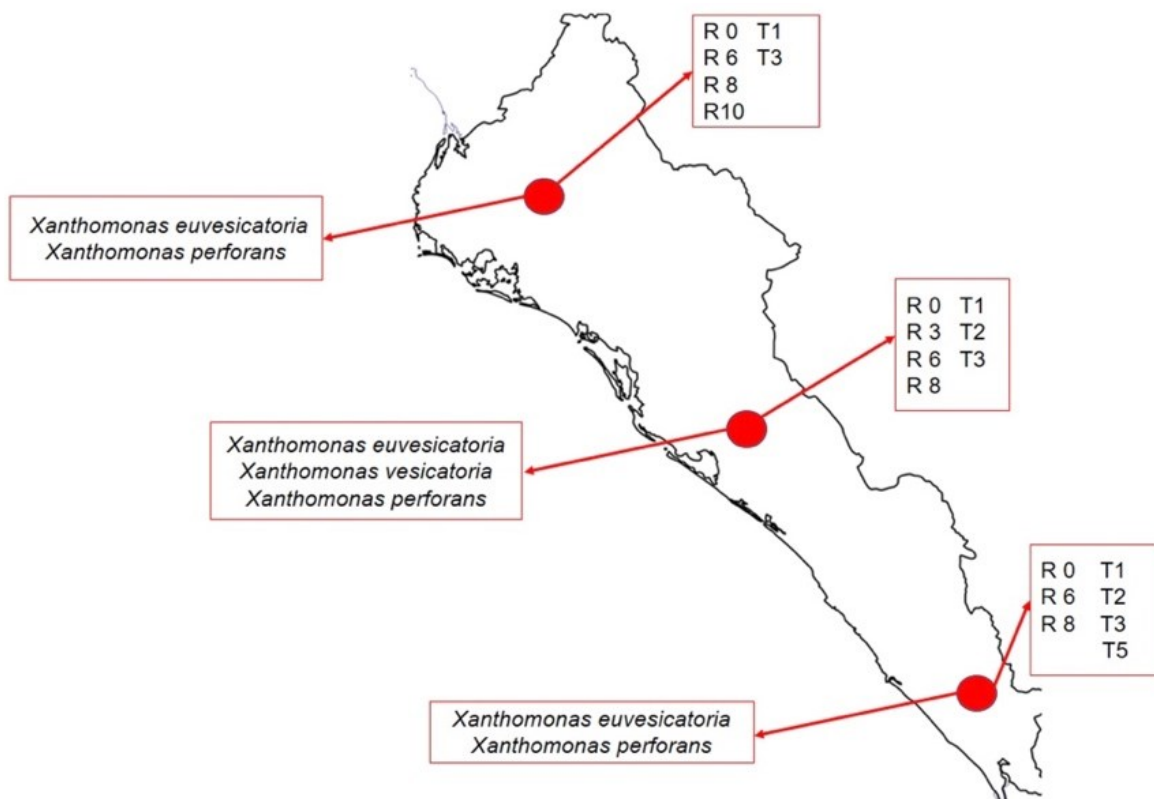


Figure 2. Distribution of species and races of *Xanthomonas* isolated from tomato and chili pepper in fields distributed throughout the state of Sinaloa, Mexico, during the 2016–2017 cycle.

Figura 2. Distribución de especies y razas de *Xanthomonas* aisladas de jitomate y chile en campos distribuidos en el estado de Sinaloa, México durante el ciclo 2016–2017.

case of chili pepper, the *Xanthomonas* spp. races were distributed as follows: in the north (Ahome and Guasave), the races found were P0, P6, P8 and P10; in the center (Culiacán, Navolato and Elota) P0, P3, P6 and P8; south (Escuinapa), P0, P6 and P8, with races P0, P6 and P8 being predominant in the entire country (Figure 2).

Along with the identification of *Xanthomonas* spp. using specific primers, there are studies that have analyzed DNA sequences and have carried out multilocus phylogenetic analyses to distinguish the various *Xanthomonas* species that infect tomato and chili peppers in several countries (Abbasi *et al.*, 2015; Schwartz *et al.*, 2015; Timilsina *et al.*, 2015; Roach *et al.*, 2018). Therefore, further phylogenetic studies with the sequencing of *Xanthomonas* spp. DNA to obtain more information on their origin and diversity in the state of Sinaloa and in other tomato and chili pepper producing states in Mexico.

CONCLUSIONS

The information produced in this study confirms that the species *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. vesicatoria* are found in tomato fields in the state of Sinaloa. Meanwhile, in chili pepper fields, *X. euvesicatoria* and *X. perforans* were found. In addition, the presence of races T1, T2, T3 and T5 was found in tomato, along with races P0, P3, P6, P8 and P10 in chili pepper. This is the first report of the presence of *X. perforans* in Mexico. Therefore, further studies are required to deposit representative sequences of each *Xanthomonas* species in the GenBank, understand the sensitivity of these strains to bactericides, as well as to generate data on epidemiology and the management of these phytopathogenic bacteria in Mexico. Likewise, it is important to point out that the presence of *X. gardneri* was not found.

la población de *Xanthomonas* spp. Las razas que predominaron en Sinaloa fueron P0, P6 y P8, a diferencia del año 2001, en el cual la raza predominante fue la P3.

En el cultivo de jitomate en campos de Sinaloa, se detectaron las razas T1, T2, T3 y T5 de *Xanthomonas*. Con base en datos de distribución y frecuencia de las cepas, al norte del estado de Sinaloa (Ahome y Guasave) se encuentran las razas T1 y T3; en el centro (Culiacán, Navolato y Elota) las razas T1, T2 y T3; al sur (Escuinapa) las razas T1, T2, T3 y T5, siendo las razas T1 y T3, las predominantes en todo el estado (Figura 2). En el caso de chile, las razas de *Xanthomonas* spp. se distribuyeron de la siguiente manera: al norte (Ahome y Guasave) se encontraron las razas P0, P6, P8 y P10; en el centro (Culiacán, Navolato y Elota) las razas P0, P3, P6 y P8; al sur (Escuinapa) las razas P0, P6 y P8; siendo las razas P0, P6 y P8 las predominantes en todo el estado (Figura 2).

Además de la identificación de *Xanthomonas* spp. mediante iniciadores específicos, existen algunos estudios que han analizado secuencias de ADN y realizado análisis filogenéticos multilocus para la distinción de las diversas especies de *Xanthomonas* que infectan a jitomate y chile en diversos países (Abbasi *et al.*, 2015; Schwartz *et al.*, 2015; Timilsina *et al.*, 2015; Roach *et al.*, 2018). Por lo que, se sugiere realizar posteriores estudios filogenéticos con secuencias de ADN de *Xanthomonas* spp. para obtener mayor información sobre su origen y diversidad genética en el estado de Sinaloa y en otros estados productores de jitomate y chile en México.

CONCLUSIONES

La información generada en este estudio confirmó que en campos con jitomate en el estado de Sinaloa se encuentran las especies *X. euvesicatoria*,

LITERATURE CITED

- Abbasi PA, Khabbaz SE, Weselowski B and Zhang L. 2015. Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology* 61: 1–9. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0228>
- Adhikari P, Adhikari TB, Louws FJ and Panthee DR. 2020. Advances and challenges in bacterial spot resistance raceing in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1734. <https://doi.org/10.3390/ijms21051734>
- Bogatzevska N, Vancheva-Ebben T, Vasileva K, Kizheva Y and Moncheva P. 2021. An overview of the diversity of pathogens causing bacterial spot on tomato and chili pepper in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 27(1): 137–146. <https://agrojournal.org/27/01-19.pdf>
- Bouzar H, Jones JB, Stall RE, Hodge NC, Minsavage GV, Benedict AA and Alvarez AM. 1994. Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology* 31: 753–755. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-663>
- Bouzar H, Jones JB, Somodi GC, Stall RE, Daouzli N, Lambe RC, Felix-Gastelum R and Trinidad-Correa R. 1996. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and chili pepper fields of Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18: 75–77. <http://dx.doi.org/10.1080/07060669609500659>
- Carrillo-Fasio JA, Sánchez-Bautista L, García-Estrada RS, Allende-Molar R y Márquez-Zequera I. 2001. Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. presentes en el estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 248–250. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61219219.pdf>
- Hartman GL and Yang CH. 1990. Occurrence of three races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on chili pepper and tomato in Taiwan. *Plant Disease* 74: 252.
- Jibrin MO, Potnis N, Timilsina S, Minsavage GV, Vallad GE, Roberts PD, Jones GB and Goss EM. 2018. Genomic inference of recombination-mediated evolution in *Xanthomonas euvesicatoria* and *X. perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e136–e118. <https://doi.org/10.1128/AEM.00136-18>
- Jibrin MO, Timilsina S, Minsavage GV, Vallad GE, Roberts PD, Goss EM and Jones JB. 2022. Bacterial spot of tomato and chili pepper in Africa: diversity, emergence of T5 race, and management. *Frontiers in Microbiology* 13:835647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.835647>
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE and Schaad NW. 2004. Reclassification of *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and chili pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 755–762. <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>
- X. perforans* y *X. vesicatoria*. Mientras que, en campos con chile se detectó a *X. euvesicatoria* y *X. perforans*. Además, se registró la presencia de las razas T1, T2, T3 y T5 para jitomate; así como, las razas P0, P3, P6, P8 y P10 para chile. Este es el primer reporte de la presencia de *X. perforans* en México. Por lo que se requiere de estudios posteriores para depositar secuencias representativas de cada especie de *Xanthomonas* en el GenBank, conocer la sensibilidad de estas cepas a bactericidas; además de, generar datos sobre epidemiología y manejo de estas bacterias fitopatógenas en México. Asimismo, es importante resaltar que no se detectó la presencia de *X. gardneri*.

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

- Király Z, Kelman Z, Solymosy L and Voros J. 1974. *Methods in Plant Pathology*. With special reference to raceing for disease resistance. Elsevier Scientific Publishing Company. New York. pp. 153-166.
- Koike ST, Gladders P and Paulus AO. 2007. *Vegetable Diseases: A colour Handbook*. Manson Publishing, London, UK. 448 p.
- Kousik CS and Ritchie DF. 1995. Isolation of chili pepper races 4 and 5 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from diseased chili peppers in Southeastern U.S. fields. *Plant Disease* 79: 540.
- Lue YS, Deng WL, Wu YF, Cheng AS, Hsu ST and Tzeng KC. 2010. Characterization of *Xanthomonas* associated with bacterial spot of tomato and chili pepper in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 19: 181–190.
- Obradovic A, Mavridis A, Rudolph K, Janse JD, Arsenijevic M, Jones JB, Minsavage GV and Wang JF. 2004. Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from chili peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 110: 285–292. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019797.27952.1d>
- O'Garro LW. 1998. Bacterial spot of tomato and chili pepper on four East Caribbean islands: Races, their abundance, distribution, aggressiveness, and prospects for control. *Plant Disease* 82: 864–870.
- Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shantharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, and Jones JB. 2015. Bacterial spot of tomato and chili pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology* 16(9): 907–920. <https://doi.org/10.1111/mpp.12244>

- Quezado-Duval AM e Camargo LEA. 2004. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira* 22(1):80–86.
- Roach R, Mann R, Gambley CG, Shivas RG and Rodoni B. 2018. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *European Journal of Plant Pathology* 150: 595–608. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1303-9>
- Rotondo F, Bernal E, Ma X, Lewis Ivey ML, Sahin F, Francis DM and Miller SA. 2022. Shifts in *Xanthomonas* spp. causing bacterial spot in processing tomato in the Midwest of the United States. *Canadian Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2047788>
- Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota, USA.
- Schwartz AR, Potnis N, Timilsina S, Wilson M, Patané J, Martins JJr, Minsavage GV, Dahlbeck D, Akhunova A, Almeida N, Vallad GE, Barak JD, White FF, Miller SA, Ritchie D, Goss E, Bart RS, Setubal JC, Jones JB and Staskawicz BJ. 2015. Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting chili pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Frontiers in Microbiology* 6:535. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00535>
- Sharma S and Bhattarai K. 2019. Progress in developing bacterial spot resistance in tomato. *Agronomy* 9: 26. <https://doi.org/10.3390/agronomy9010026>
- Stall RE, Jones JB and Minsavage GV. 2009. Durability of resistance in tomato and chili pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology* 47: 265–284. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081752>
- Sitthitanasin S, Korakngam C, Kanhayart T, Kositcharoenkul N, Patarapuwadol S, Kosiratana W and Watcharachaiyakup J. 2020. Characterization of *Xanthomonas* causing of bacterial leaf spot of tomato and chili pepper in Thailand. *Thai Agricultural Research Journal* 38(1): 80–89. <https://doi.org/10.14456/thaidoa-agres.2020.7>
- Timilsina S, Jibrin MO, Potnis N, Minsavage GV, Kebede M, Schwartz A, Bart R, Staskawicz B, Boyer C, Vallad GE, Pruvost O, Jones JB and Goss EM. 2015. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and chili pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Appl Environmental Microbiology* 81:1520–1529. <https://doi.org/10.1128/AEM.03000-14>

# Biodegradable films with fungistatic activity for the postharvest control of *Fusarium solani* in Hass avocado fruit

## Películas biodegradables con actividad fungistática para el control postcosecha de *Fusarium solani* en fruto de aguacate Hass

Wendy Abril Coyotl-Pérez, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala 90700, México; Nemesio Villa-Ruano, CONACyT-Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México; Efraín Rubio-Rosas\*, Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México.

\*Corresponding author: efrain.rubio@correo.buap.mx

Received: March 31, 2022.

Accepted: July 11, 2023.

Coyotl-Pérez WA, Villa-Ruano N and Rubio-Rosas E. 2023. Biodegradable films with fungistatic activity for the postharvest control of *Fusarium solani* in Hass avocado fruit. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 343-371.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2303-4>

First DOI publication: July 31, 2023.

Primera publicación DOI: 31 de Julio, 2023.

**Abstract.** Little is known on the use of biodegradable films for the control of diseases in crops of agricultural importance. Consequently, the objective of this work was to determine the efficacy of chitosan hybrid films impregnated with thyme essential oil on Hass avocado fruits previously infected with *Fusarium solani* isolated from the northeastern highlands of Puebla, Mexico. The native strain of *F. solani* was morphologically and

**Resumen.** Existen escasa información sobre el uso de películas biodegradables para el control de enfermedades en cultivos de importancia agrícola. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de películas híbridas de quitosano con aceite esencial de tomillo sobre frutos de aguacate Hass previamente infectados con *Fusarium solani* proveniente de la sierra nororiental de Puebla, México. Se identificó morfológica y molecularmente la cepa nativa de *F. solani* y se evaluó la actividad fungistática de tres películas de quitosano suplementadas con 0.7% (FT1), 1.0% (FT2) y 1.3% (FT3) de aceite esencial de tomillo en condiciones *in situ* sobre el crecimiento de *F. solani* en frutos de aguacate. La textura, transmitancia y opacidad de las películas fueron obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y espectrometría UV-Vis, respectivamente. De manera general, se observó que aquellas películas con mayor concentración de aceite esencial de tomillo (1-1.3% p/v) presentaron menor transmitancia en el rango de luz UV y mayor

molecularly identified and the fungistatic activity of three chitosan films supplemented with 0.7% (FT1), 1.0% (FT2) and 1.3% (FT3) of thyme essential oil was evaluated *in situ* on the growth of *F. solani* in avocado fruits. Texture, transmittance and opacity of the films were obtained by scanning electron microscopy and UV-Vis spectrometry, respectively. Overall, it was recorded that films with a higher concentration of thyme essential oil (1-1.3% w/v) presented lower transmittance in the UV light range and higher opacity. Avocado fruits infected with *F. solani* simultaneously treated with FT2 and FT3 reduced the appearance of symptoms while preserved firmness, as well as fiber, fat, reducing sugars, and protein content ( $p < 0.01$ ). In the same context, these materials promoted the conservation of the content of the nutraceuticals linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and palmitoleic acid for 21 days. These results suggest that the hybrid films generated in the present study have the ability to control fusariosis caused by this fungus, prolonging the shelf life of Hass avocado fruit.

**Key words:** Chitosan, *Thymus vulgaris*, phytopathogens, rot, bromatological analysis, fatty acids.

The *Fusarium* genus is a group of phytopathogenic fungi associated to dry and soft rot of several plant species. This genus affects yields and fruit quality because of their ability to synthesize mycotoxins harmful to humans. Some of the mycotoxins biosynthesized by this genus are deoxynivalenol and zearalenones which disturb animal health, including that of humans (Liu *et al.*, 2022). Common toxigenic species are *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum* and *F. solani* (Liu *et al.*, 2022). *F. solani* is a phytopathogenic fungus linked to plant wilt affecting root and aerial parts,

opacidad. Los frutos de aguacate infectados con *F. solani* simultáneamente tratados con las películas FT2 y FT3 redujeron la aparición de síntomas de infección preservando la firmeza, así como el contenido de fibra, grasa, azúcares reductores y proteína de manera significativa ( $p < 0.01$ ). De igual forma, promovieron la conservación del contenido de los nutraceuticos ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido palmitoleico por 21 días. Estos resultados sugieren que dichos materiales tienen la capacidad de controlar la fusariosis generada por este hongo prolongando la vida útil del fruto de aguacate Hass.

**Palabras clave:** Quitosano, *Thymus vulgaris*, fitopatógeno, pudrición, análisis bromatológicos, ácidos grasos.

El género *Fusarium*, es un grupo de hongos fitopatógenos responsables de la pudrición seca y blanda de varias especies vegetales. Este género afecta el rendimiento y la calidad del fruto, además de producir micotoxinas que son perjudiciales para el ser humano. Algunas de las micotoxinas biosintetizadas por este género son el deoxinivalenol y zearalenonas que pueden afectar la salud animal incluyendo la humana (Liu *et al.*, 2022). Dentro de las especies toxigénicas comunes se encuentran *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum* y *F. solani* (Liu *et al.*, 2022). *Fusarium solani* es un hongo fitopatógeno responsable de la marchitez de algunas plantas, ya que afecta desde la raíz hasta la parte aérea provocando un daño que puede ser apreciado a simple vista (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha registrado la presencia de *F. solani* en maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), cilantro (*Coriandrum sativum*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), trigo (*Triticum aestivum*), papa (*Solanum tuberosum*), aguacate

and in many cases, this damage can be observed at first glance (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). The presence of *F. solani* has been recorded in maize (*Zea mays*), common bean (*Phaseolus vulgaris*), coriander (*Coriandrum sativum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), wheat (*Triticum aestivum*), potato (*Solanum tuberosum*), avocado (*Persea americana*) among other crops (Kong *et al.*, 2022). Hass avocado fruit represents an important economic income for Mexico since this country is the main producer and exporter worldwide (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). High fruit requirements by consumers are regarded to its content of vitamins, fiber, reducing sugars proteins, minerals and unsaturated fatty acids accumulated in its pulp (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). Some of these components are exploited by opportunistic microorganisms for their own benefit, causing a collateral decrease in fruit quality (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). *Fusarium solani* is tagged as a phytopathogenic fungus of Hass avocado fruit because of its ability to cause plant wilt (Hernández-Medina *et al.*, 2015). A substantial incidence of this fungus is presented during postharvest period which considerably limits its commercialization (Wanjiku *et al.*, 2020). Although high demand and production of this fruit has increased, losses persists because of diverse biotic and abiotic factors which change its normal physiology (Bowen *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2021). It has been recorded that wrong fruit management during postharvest period enhances phytosanitary issues (Ramírez-Gil *et al.*, 2021). These problems have turned into increasing crisis because of the non-discriminated use of agrochemicals. In the same context, the excessive use of these substances may induce microbial resistance (Pandey *et al.*, 2021). Due to the latter arguments, considering highly efficient control agents with negligible side effects against environment and public health is desirable. Based in latter points, our research group has focused

(*Persea americana*) entre otros cultivos (Kong *et al.*, 2022). El fruto del aguacate Hass representa un importante ingreso económico para México puesto que es el principal productor y exportador a nivel mundial (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). Dicho fruto presenta alta demanda debido a las propiedades nutrimentales que ofrece al consumidor destacando el contenido de vitaminas, fibra, proteínas, azúcares reductores, minerales y ácidos grasos insaturados acumulados en su pulpa (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). Algunos de estos componentes son aprovechados por microorganismos oportunistas para su beneficio afectando colateralmente la calidad del fruto (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). *Fusarium solani* es catalogado como un hongo fitopatógeno presente en el aguacate Hass porque causa marchitez o tristeza (Hernández-Medina *et al.*, 2015). Este hongo se ha caracterizado por estar presente en el periodo de poscosecha siendo un factor que limita la comercialización del aguacate (Wanjiku *et al.*, 2020). Aunque se ha observado un incremento en la producción del fruto, las pérdidas persisten debido a diversos factores bióticos y abióticos que alteran su fisiología (Bowen *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2021). Se tiene registrado que las malas prácticas en el manejo del fruto durante la poscosecha provocan el desarrollo de problemas fitosanitarios (Ramírez-Gil *et al.*, 2021). Estos problemas se han convertido en una crisis que incrementa cada día por el uso desmedido de agroquímicos. Así mismo, la aplicación indiscriminada estas sustancias aumenta la resistencia microbiana (Pandey *et al.*, 2021). Por lo anterior, se ha optado por el uso de agentes de control de hongos fitopatógenos que sean eficaces y no perjudiciales para el medio ambiente y la salud pública. En función de lo anterior, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el diseño y aplicación de películas fungistáticas sobre base quitosano y enriquecidas con aceites esenciales de canela y tomillo para el control de distintos patógenos del

in the design and application of fungistatic films containing chitosan and essential oils of cinnamon and thyme for the control of diverse pathogens of Hass avocado. These materials efficiently modulated the standard growth of *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea* in avocado fruits under postharvest conditions (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Similarly, results on the use of chitosan films impregnated with thyme essential oil reported by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a), indicated that these materials represent a viable alternative for controlling the soft rot raised by *C. rosea* infection in avocado fruit. Then, the exploration of these films on other pathogens of the same fruit is desirable. As is known, sustainable agriculture faces these problems with the aim of limiting the constant practice of unsafe agents (Eke *et al.*, 2020). Currently, the use of antifungal materials such as chitosan has acquired substantial importance due to their application in postharvest diseases (Yan *et al.*, 2021). However, chitosan is a polymer showing limitations in its antifungal activity and can be ineffective against specific filamentous fungi (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Then, hybrid materials made with chitosan and essential oils are visualized as an agroecological alternative to reduce fungal diseases during postharvest period (Fernández *et al.*, 2015). On the bases of latter arguments, this work aimed to determine the efficacy of chitosan films impregnated with thyme essential oil on Hass avocado fruits, previously infected with a native strain of *Fusarium solani* isolated from symptomatic fruits collected in the northern highlands of Puebla, Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

**Isolation and identification of an associated fungus.** *Fusarium solani* was isolated from

aguacate Hass. Los materiales generados, han mostrado controlar de manera eficiente el crecimiento de *Fusarium verticillioides* y *Clonostachys rosea* en frutos de aguacate en condiciones de poscosecha (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). En este contexto, los resultados sobre el uso de películas de quitosano impregnadas con el aceite esencial de tomillo reportados por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a), señalaron que estos materiales son una alternativa viable para controlar la pudrición blanda causada por *C. rosea* en aguacate, por lo que la exploración de estas películas sobre otros patógenos del mismo fruto es altamente recomendable. La agricultura sostenible busca hacer frente a estos problemas con el fin de limitar el uso de productos sintéticos con efectos tóxicos (Eke *et al.*, 2020). Actualmente, el uso de materiales antifúngicos como el quitosano ha adquirido una gran importancia principalmente para el control de enfermedades poscosecha (Yan *et al.*, 2021). Sin embargo, el quitosano no es un polímero con actividad antifúngica de amplio espectro y puede ser inefectivo contra ciertos hongos filamentosos (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Los materiales hechos a base de quitosano y aceites esenciales representan una alternativa agroecológica para reducir la incidencia de enfermedades fúngicas durante el periodo poscosecha (Fernández *et al.*, 2015). Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de películas de quitosano impregnadas con aceite esencial de tomillo, sobre frutos de aguacate Hass infectados con una cepa nativa de *Fusarium solani* aislada y caracterizada a partir de frutos sintomáticos colectados en la Sierra Nororiental de Puebla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento e identificación del hongo asociado.** *Fusarium solani* fue aislado de aguacates



avocado fruits showing symptoms of soft rot as a consequence of the exploration of associated fungi of Hass avocado isolated from the northern highlands of Puebla which were included in investigations performed by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) during June, 2021 in Yaonáhuac, Puebla, México (19°56'55" N 97°26'26" W; 1997 masl). Once isolated, the fungus was kept in potato dextrose agar (PDA). In addition, 1 cm<sup>2</sup> PDA microcultures were prepared for the identification and description of fungal reproductive structures. The microcultures were stored at 25 °C during 5 d in the dark and the structures were observed in a Primo Star Carl Zeiss optic microscope.

**Molecular identification.** The fungus was identified by genomic DNA extraction using the E.Z.N.A Plant DNA DS Mini Kit (Omega Bio-Tek) and the amplification of molecular markers using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) for the obtainment of partial sequence of the internal transcribed spacer of the ribosomal 18S gene (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). Additionally, the primers EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) and EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) were used to obtain the partial sequence of the translation elongation factor 1-alpha (TEF-1 $\alpha$ ) (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). The resulting amplicons were sequenced using commercial services of Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Once obtained, the sequences were compared with those deposited in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), through multiple alignments using BLAST software.

**Pathogenicity tests.** Cultures of 10 days grown in PDA were incubated at 4 °C for 12 h and exposed to solar radiation for 3 h, during three consecutive days. This action was done for stimulating the generation

con síntomas de pudrición blanda como resultado de la exploración de hongos asociados al fruto de aguacate Hass de la Sierra Nororiental del estado de Puebla, en investigaciones realizadas por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) durante junio de 2021 en Yaonáhuac, Puebla, México (19°56'55" N 97°26'26" W; 1997 msnm). Una vez aislado, el hongo se mantuvo en medio agar dextrosa y papa (PDA). Adicionalmente, se realizaron microcultivos de 1 cm<sup>2</sup> en PDA para la identificación y descripción de las estructuras reproductivas del hongo. El microcultivo se almacenó a 25 °C durante 5 d en oscuridad y las estructuras fueron observadas en microscopio óptico Primo Star Carl Zeiss.

**Identificación molecular.** El hongo fue identificado mediante extracción del ADN genómico con el Kit E.Z.N.A Plant DNA DS Mini Kit (Omega Bio-Tek) y amplificación de marcadores moleculares usando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) para la obtención de la secuencia parcial del espaciador transcrito interno del gen ribosomal 18S (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). Además, se emplearon los iniciadores EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) y EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) para la obtención de la secuencia parcial del gen del factor de elongación 1-alfa (TEF-1 $\alpha$ ) (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). Los amplicones resultantes se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Una vez obtenidas, las secuencias fueron comparadas con aquellas depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante alineamientos múltiples usando el programa BLAST.

**Pruebas de patogenicidad.** Siembras de hongos de 10 días de crecimiento en PDA, fueron incubados a 4 °C por 12 horas y expuestos a la radiación

of reproductive structures. Pathogenicity tests were carried out in healthy avocado fruits collected in the same zone of study in accordance with Coyotl-Perez *et al.* (2022a). The reproductive structures (conidia) were recovered from culture medium with sterile saline solution using a micropipette of 200  $\mu\text{L}$  capacity to be finally adjusted to 10,000 conidia per mL using a Neubauer chamber. A total of 100 conidia were inoculated in each healthy fruit by mechanical penetration with the aim to increase infection rate. The avocados were incubated at room temperature (25 °C), 70% relative humidity and photoperiod of 12 h:12 h light: darkness for 21 days. Symptoms and signs of rot were followed daily during the same period of time.

**Phylogenetic analysis.** The phylogenetic analysis of the native strain of *F. solani* was performed as reported by Romero-Arenas *et al.* (2022), using Clustal X 2.0 software. Multiple alignments were separately done with ITS and EF-1 $\alpha$ , respectively. Posteriorly, concatenation (assembly) and generation of phylogenetic tree were both performed with the predictive evolution software MEGA version 11.0.11.

**Quantification of *in vitro* antifungal activity.** The essential oil of thyme used in this investigation was extracted according to the protocol previously described by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). The chemical composition of the essential oil is described in Table 1. The obtainment of minimum inhibitory concentration (MIC) was achieved by microdilution using potato dextrose broth (PDB) in 96 well-plate added with resazurin (1 mM; Sigma-Aldrich Co. St Louis MO) as indicator of cell viability in a final volume of 300  $\mu\text{L}$ . Hyphal discs of 5 mm diameter were placed in each well of the plate at 28 °C for 48 h with different concentrations of thyme essential oil (0.1-6 mg mL<sup>-1</sup>) emulsified with absolute ethanol. Hyphal discs were obtained

solar por 3 horas, durante tres días consecutivos. Lo anterior con la finalidad de estimular la generación de estructuras reproductivas. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos de aguacate Hass asintomáticos colectados en la misma zona de estudio de acuerdo con Coyotl-Perez *et al.* (2022a). Las estructuras reproductivas (conidias) fueron recuperadas del medio de cultivo con solución salina estéril usando una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  para finalmente ajustarse a una concentración de 10,000 conidios por mL usando una cámara de Neubauer. Un total de 100 conidias fueron inoculadas en cada fruto sano mediante penetración mecánica, con el objetivo de aumentar las probabilidades de infección. Los aguacates fueron incubados a temperatura ambiente (25 °C) a una humedad relativa de 70 °C y fotoperiodo de 12 h:12 h de luz y oscuridad durante por 21 días. Los síntomas y signos de pudrición blanda fueron monitoreados diariamente durante el mismo periodo de tiempo.

**Análisis filogenético.** El análisis filogenético de la cepa nativa de *F. solani* se realizó de acuerdo a lo reportado por Romero-Arenas *et al.* (2022), usando el programa Clustal X versión 2.0. Los alineamientos múltiples se efectuaron con las secuencias ITS y EF-1 $\alpha$  por separado. Posteriormente, se utilizó el programa de análisis evolutivo MEGA versión 11.0.11 para realizar la concatenación (ensamblaje) de ambas secuencias y la obtención del árbol filogenético.

**Cuantificación de la actividad antifúngica *in vitro*.** El aceite esencial de tomillo usado en esta investigación se extrajo y evaluó de acuerdo con los protocolos descritos previamente por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). La composición química del aceite se detalla en el Cuadro 1. La obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se obtuvo mediante microdilución en caldo dextrosa y papa (PDB) en microplacas de Elisa de 96 pocillos usan-

**Table 1. Chemical composition of the thyme essential oil used as antifungal agent in the chitosan films evaluated in this investigation. The chemical profile has been previously reported by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a).****Cuadro 1. Composición química del aceite esencial de tomillo usado como agente antifúngico en las películas de quitosano evaluadas en la presente investigación. El perfil químico ha sido reportado previamente por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a).**

| Compound             | Retention index | Abundance (%) |
|----------------------|-----------------|---------------|
| Alpha-Pinene         | 939             | 2.5           |
| Camphene             | 946             | 2.8           |
| Beta-Pinene          | 974             | 2.1           |
| Alpha-Phellandrene   | 1002            | 0.5           |
| (2E)-Hexenyl acetate | 1010            | 2.9           |
| o-Cymene             | 1022            | 15.7          |
| Gamma-Terpinene      | 1054            | 12.4          |
| Linalool             | 1095            | 1.6           |
| 1-Terpineol          | 1130            | 2.4           |
| Camphor              | 1141            | 0.5           |
| Borneol              | 1165            | 1.4           |
| Alpha-Terpineol      | 1186            | 0.3           |
| Thymol, methyl eter  | 1232            | 1.7           |
| Thymol               | 1289            | 43.6          |
| Beta-Cubebene        | 1387            | 3.3           |
| Beta-Elemene         | 1389            | 0.5           |
| Beta-Caryophyllene   | 1417            | 1.2           |
| <b>Total</b>         |                 | <b>95.4</b>   |

from cultures of *F. solani* of 7 days grown in PDA. At the end of this time, absorbance was recorded at 630 nm using PDB plus resazurin and PDB with resazurin plus hyphal discs as controls to normalize acquired results.

To obtain MIC, twenty replicates (n=20) were considered for each point of the dose-response curve and the percentage of inhibition was calculated based in the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\bar{x} \text{ abs EO}) - (\bar{x} \text{ abs viability})}{(\bar{x} \text{ abs inhibition}) - (\bar{x} \text{ abs viability})} \times 100$$

Where:

$\bar{x}$ : Arithmetic mean

Abs: Absorbance value at 630 nm

EO: Essential oil

do resazurina (1 mM; Sigma-Aldrich Co. St Louis MO) como indicador de viabilidad en un volumen final de 300  $\mu$ L. Discos hifales de 5 mm de diámetro fueron colocados en cada pozo e incubados a 28 °C por 48 h con diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo (0.1-6 mg mL<sup>-1</sup>) emulsificado en etanol absoluto. Los discos hifales fueron obtenidos a partir de cultivos de *F. solani* de 7 d crecidos en PDA. Al término de este tiempo, la absorbancia se determinó a 630 nm usando PDB más resazurina y PDB con resazurina más discos hifales como controles para normalizar los resultados obtenidos.

Para obtener la MIC se efectuaron 20 repeticiones (n=20) para cada punto de la curva dosis-respuesta y se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente formula:

**Film elaboration and physicochemical characterization.** Films were obtained according to the methodology reported by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) using high molecular weight chitosan from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) with slight modifications. Three concentrations of thyme essential oil (0.7, 1.0 y 1.3% w/v) were mixed with 0.1 L chitosan solution (1% w/v) under constant stirring at 50 °C for 1.5 h. Twenty milliliters of this solution were spread into Petri dishes of 9 cm diameter to be dehydrated at 25 °C in a glass desiccator containing silica gel for 5 d. The films were manually scratched out from the Petri dish and named FT1, FT2 y FT3 according to their increasing oil concentration order. Posteriorly, the films were subjected to physicochemical analysis and biological assessment in accordance with Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) and Morales-Rabanales *et al.* (2022). The physicochemical characterization included transmittance and opacity degree by UV-Vis spectrophotometry as well as texture by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL JSM-6610 apparatus (Akishima, Kanto, Japón). Conditions for SEM were those reported by Morales-Rabanales *et al.* (2022). On the other hand, width of each film was measured (n=10) using a digital micrometer iGaging with 0.001 mm precision. Transmittance and opacity were associated to width and absorbance according to the same authors (Morales-Rabanales *et al.*, 2022). Biological tests with obtained materials are described in the next section.

**Fungistatic activity of chitosan films and thyme essential oil.** Healthy fruits collected from the zone of study were transported to the laboratory to be sanitized by immersion in a 20% sodium hypochlorite solution for 1 h and posteriorly rinsed with sterile distilled water. Twenty-five avocados (n=25) were used for each treatment and these

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\bar{x} \text{ abs AE}) - (\bar{x} \text{ abs viabilidad})}{(\bar{x} \text{ abs inhibición}) - (\bar{x} \text{ abs viabilidad})} \times 100$$

Donde:

$\bar{x}$ : es la media aritmética

Abs: es el valor de la absorbancia a 630 nm

AE: Aceite esencial

**Elaboración de películas y caracterización fisicoquímica.** Las películas se obtuvieron de acuerdo a la metodología reportada por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) usando quitosano de peso molecular medio adquirido de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) con ligeras modificaciones. Tres concentraciones de aceite esencial de tomillo (0.7, 1.0 y 1.3% p/v) fueron mezcladas con 0.1 L de una solución de quitosano al 1% (p/v) en agitación constante a 50 °C durante una hora y media. Veinte mililitros de la solución fueron vertidos en placas de Petri de 9 cm de diámetro para ser deshidratadas a 25 °C en un desecador de vidrio conteniendo gel de sílice durante 5 d. Las películas fueron extraídas manualmente de la placa Petri y denominadas como FT1, FT2 y FT3 en orden creciente de concentración de aceite. Posteriormente, fueron sometidas a análisis fisicoquímicos y evaluación biológica de acuerdo con Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) y Morales-Rabanales *et al.* (2022). En la parte fisicoquímica se determinó la transmitancia y opacidad mediante espectrofotometría UV-Vis así como la textura por microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un aparato JEOL JSM-6610 (Akishima, Kanto, Japón). Las condiciones de los ensayos SEM fueron aquellas reportadas por Morales-Rabanales *et al.* (2022). Por otra parte, se midió el grosor de cada película (n=10) con un micrómetro digital iGaging con precisión de 0.001 mm. La opacidad y transmitancia fueron asociadas al grosor y la absorbancia

were inoculated in a single point of the fruit with 100 conidia dissolved in saline solution (20  $\mu$ L) using a micropipette of 20  $\mu$ L capacity. Posteriorly, the fruits were covered with a specific film (FT1-FT3). The amount of conidia in the solution was calculated using a Neubauer chamber. Control groups consisted of infected avocados without film (control of infection), healthy avocados without film (control of non-infection) and, avocados covered with films of pure chitosan without essential oil. Experimental groups were incubated at 25 °C and 70% relative humidity under photoperiod of 12 h light and 12 h darkness during 21 days and symptom and sign appearance such as loss of turgor and mycelium emergence were documented during 21 d. Simultaneously, *in situ* evaluation was done over film surface using 1 cm<sup>2</sup> squares added with 100 viable conidia diluted in a final volume of 10  $\mu$ L. PDA (1 cm<sup>2</sup>) was used as a control of conidial germination which was inoculated with the same amount of cells. The films were incubated at 25 °C and relative humidity of 70% under photoperiod of 12 h light and 12 h darkness for 7 d. At the end of this period, the materials were observed under optic microscope to endorse mycelium emergence. Treatments with presence of mycelium were re-isolated and maintained in PDA to corroborate *F. solani* identity.

**Quality parameters analysis.** Firmness was the first quality parameter in accordance with Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). Additionally, the nutritional composition (protein, reducing sugars, fat and fiber) was determined through the reported methodology of AOAC (2019). Complementarily, the levels of linoleic acid (18:2 n-6), oleic acid (18:1 n-9), palmitic acid (16:0) and palmitoleic acid (16:1) were estimated as nutraceutical parameters of the fruit (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a).

de las películas de acuerdo con los mismos autores (Morales-Rabanales *et al.*, 2022). Las pruebas biológicas con los materiales obtenidos se detallan en la siguiente sección.

**Actividad fungistática de las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo.** Frutos sanos de aguacate colectados en la zona de estudio fueron trasladados al laboratorio para ser sanitizados por inmersión con hipoclorito de sodio al 20% durante 1 hora y posteriormente se enjugaron con agua destilada estéril. Para cada tratamiento se utilizaron 25 aguacates (n=25), los cuales fueron inoculados en un solo punto del fruto con 100 conidios disueltos con solución salina (20  $\mu$ L) usando una micropiteta de 20  $\mu$ L de capacidad. Posteriormente, se les colocó una película específica (FT1-FT3). La cantidad de conidios en la solución se calculó usando una cámara de Neubauer. Los grupos controles constaron de aguacates infectados sin película (control de infección), aguacates sanos sin película (controles de no infección) y, aguacates cubiertos con películas de quitosano puro sin aceite esencial. Los grupos experimentales fueron incubados a 25 °C a una humedad relativa del 70% en fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad durante 21 días y se documentó la aparición de síntomas y signos de infección, como fueron pérdida de turgencia y aparición de micelio durante 21 d. Simultáneamente, se realizó una evaluación *in situ* sobre la superficie de las películas, donde se utilizaron cuadros de 1 cm<sup>2</sup> sobre los cuales se vertieron 100 conidios viables diluidos en un volumen final de 10  $\mu$ L. Como control de germinación conidial se empleó 1 cm<sup>2</sup> de PDA inoculado con la misma cantidad de conidios. Las películas fueron incubadas a 25 °C a una humedad relativa del 70% en fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad por 7 d. Al término de este tiempo, los materiales se observaron bajo microscopio óptico

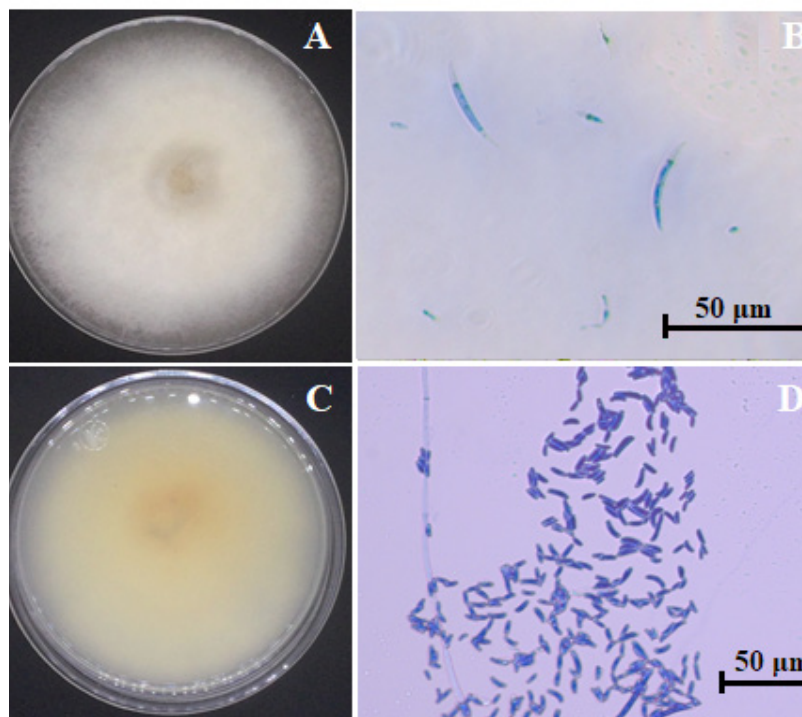
**Statistical analysis.** Data from treatments processed by Analysis of Variance coupled to Tukey Tests ( $p < 0.01$ ) using GraphPad Prism software version 8.0.1.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identification and characterization.** Morphologically, the isolated strain showed white color in the obverse of the Petri dish and cream color at the back of the same dish (Figure 1A and 1B). It showed filamentous border, cotton texture, smooth consistence and moderate radial growth (4-7 d). Macroconidia were erect, slightly curved with thin walls. Apical cells were curved and septate from

para constatar la presencia micelio. En los tratamientos en los que se observó micelio este se recolectó y se resembró en medio PDA para corroborar la presencia de *F. solani*.

**Análisis de parámetros de calidad.** Como primer parámetro de calidad, se evaluó la firmeza de acuerdo con Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). Adicionalmente, se determinó la composición nutricional (proteínas, azúcares reductores, grasa y fibra) de los frutos de aguacate bajo la metodología reportada por la AOAC (2019). Complementariamente, se determinaron los niveles de ácido linoleico (18:2 n-6), ácido oleico (18:1 n-9), ácido palmítico (16:0) y ácido palmitoleico (16:1) como valoración del contenido nutraceutico del fruto (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a).



**Figure 1. Morphology of *Fusarium solani*.** A) Radial growth observed from the obverse of Petri dish in PDA after 7 days. B) Radial growth observed from the reverse of Petri dish. C) Macroconidia observed at 50X without staining. D) Microconidia observed at 50X stained with cotton blue.

**Figura 1. Morfología de *Fusarium solani*.** A) crecimiento radial observado desde el anverso de la placa Petri en medio PDA después de 7 días. B) crecimiento radial observado desde el reverso de la placa Petri. C) Macroconidios observados a 50X sin tinción. D) Microconidios observados a 50X teñidos con azul de algodón.

which non-branched phialides emerged. The length of macroconida was from 20 to 40  $\mu\text{m}$ , these were thin, slightly curved and every macroconidium showed the presence of septa (Figure 1C). The length of microconida was from 5.96 to 10.3  $\mu\text{m}$  (Figure 1D). These morphological features were consistent with those described by Wanjiku *et al.* (2020) and Dugassa *et al.* (2021) for *Fusarium solani*.

Molecular analysis revealed that the coding sequence for the internal transcribed spacer had a homology of 98.8% with that of sequence MN523174.1 of *Fusarium solani* reported by Rivedal *et al.* (2020). The sequence was deposited at the gene bank of NCBI with the accession code OR016146. On the other hand, the sequence of 682 bp corresponding to the translation elongation factor 1-alpha, had a homology of 97.7% with the sequence HM852038.1 of *Fusarium solani* reported by Scheel *et al.* (2013).

**Phylogenetic analysis.** The evolutionary history was inferred by the Neighbor-Joining method, which allowed to predict the phylogeny of *Fusarium solani* showing the sum of branch length equal to 0.23497162 (Figure 2). The percentage of replicates was grouped in the starting test (1000 permutations) with a scale of 0.020 from the concatenation of ITS and EF-1 $\alpha$  sequences. This analysis involved 12 nucleotide sequences and the model avoided alignment gaps with a total of 1014 positions in the final dataset. Such sequences were chosen in the basis of percentage of homology with obtained sequences of the *F. solani* strain isolated in the present investigation.

The concatenated sequences belonged to the accessions described in Table 2. Most homologues to that of *F. solani* were those isolated from *Panax ginseng* from China.

**Análisis estadístico.** Los datos de los tratamientos fueron interpretados mediante un análisis de varianza acoplado a una prueba Tukey ( $p < 0.01$ ) con software GraphPad Prism versión 8.0.1.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

**Identificación y caracterización.** Morfológicamente, la cepa aislada presentó una coloración blanca en su anverso y crema en el reverso (Figura 1A y 1B). Esta mostró borde filamentosos, textura algodonosa, consistencia suave y crecimiento radial moderado (4-7 días). Los macroconidios fueron rectos y ligeramente curvados con paredes delgadas. Las células apicales se encontraron ligeramente curvadas y septadas, a partir de las cuales emergen monofialides no ramificadas. Los macroconidios midieron 20 a 40  $\mu\text{m}$  de largo, fueron delgados, ligeramente curvados y cada macroconidio presentó tres septos (Figura 1C) Los microconidios midieron de 5.96 a 10.3  $\mu\text{m}$  de largo (Figura 1D). Estas características morfológicas fueron consistentes con las descritas por Wanjiku *et al.* (2020) y Dugassa *et al.* (2021) para *Fusarium solani*.

El análisis molecular, reveló que la secuencia codificante para el espaciador transcrito interno tuvo una homología del 98.8% con la secuencia MN523174.1 de *Fusarium solani* reportada por Rivedal *et al.* (2020). La secuencia fue depositada en el banco de genes del NCBI con el número de accesoión OR016146. Por otra parte, la secuencia de 682 pb correspondiente al factor de elongación 1-alfa, tuvo una homología del 97.7% con la secuencia HM852038.1 de *Fusarium solani* reportada por Scheel *et al.* (2013).

**Análisis filogenético.** La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining, misma

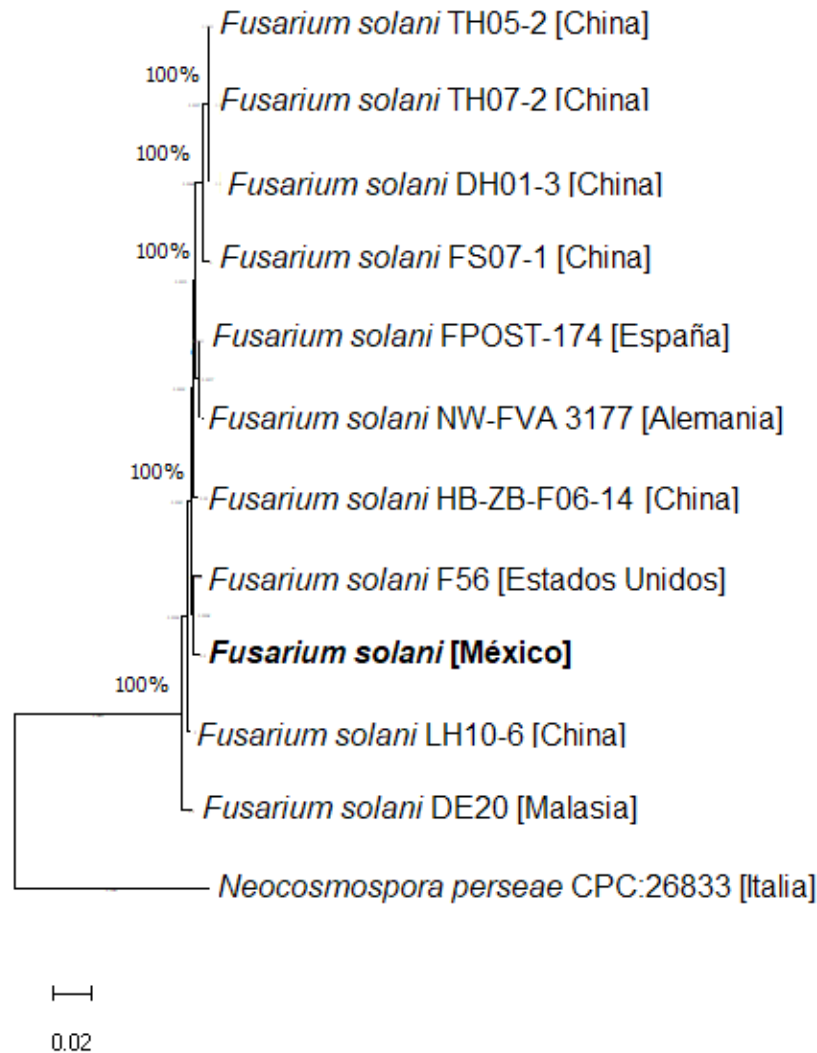


Figure 2. Phylogenetic tree of *Fusarium solani* with concatenated sequences of ITS and EF-1 $\alpha$ . The strain *F. solani* isolated from the northeast highland of Puebla is remarked in bold font.

Figura 2. Árbol filogenético de *Fusarium solani* con secuencias concatenadas de ITS y EF-1 $\alpha$ . La cepa de *F. solani* aislada de la Sierra Nororiental del estado de Puebla se resalta en letras negritas.

**Assays of antimicrobial evaluation by broth microdilution.** The results of the present study showed that thyme essential oil exerted a MIC of  $4.4 \pm 0.04$  mg mL<sup>-1</sup> on *F. solani*. It is known that essential oils work as natural antifungal agents which additionally are environmentally friendly, renewable and easily biodegradable for the conservation of several foods (Pandey *et al.*,

que permitió predecir la filogenia de *Fusarium solani* mostrando una suma de longitud de rama igual a 0.23497162 (Figura 2). El porcentaje de réplicas se agrupó en la prueba de arranque (1000 permutaciones) a una escala de 0.020 a partir la concatenación de secuencias ITS y EF-1 $\alpha$ . Este análisis involucró 12 secuencias de nucleótidos y el modelo evitó brechas de alineación con un total de 1014



**Table 2. Genic sequences extracted from the National Center for Biotechnology Information database to estimate phylogenetic relationships.****Cuadro 2. Secuencias génicas extraídas del banco de genes del National Center fo Biotechnology Information para estimar la proximidad filogenética.**

| Species                      | Strain       | Source                    | Country        | Accession ITS/TEF-1 $\alpha$ |               |
|------------------------------|--------------|---------------------------|----------------|------------------------------|---------------|
| <i>Fusarium solani</i>       | FS07-1       | <i>Panax ginseng</i>      | China          | MN636714.1                   | MN650117.1    |
| <i>F. solani</i>             | DH01-3       | Ginseng (root)            | China          | MN637839.1                   | MN650105.1    |
| <i>F. solani</i>             | TH05-2       | Ginseng (root)            | China          | MN637848.1                   | MN652892.1    |
| <i>F. solani</i>             | LH10-6       | <i>Oryza sativa</i>       | China          | MK611942.1                   | MN927129.1    |
| <i>F. solani</i>             | F56          | <i>Lilium longiflorum</i> | Estados Unidos | HQ379676.1                   | KY020039.1    |
| <i>F. solani</i>             | FPOST-174    | Strawberry                | España         | KY484986.1                   | KX215054.1    |
| <i>F. solani</i>             | HB-ZB-F06-14 | Beet                      | China          | KT213074.1                   | KT213256.1    |
| <i>F. solani</i>             | DE20         | Mangrove soil             | Malasia        | KF897899.1                   | KM580560.1    |
| <i>F. solani</i>             | TH07-2       | Ginseng (root)            | China          | MN637851.1                   | MN652894.1    |
| <i>F. solani</i>             | NW-FVA_3177  | <i>Fraxinus excelsior</i> | Alemania       | MH191237.1                   | MH220421.1    |
| <i>Neocosmospora perseae</i> | CPC:26833    | <i>Persea americana</i>   | Italia         | LT991944.1                   | LT991906.1    |
| <i>F. solani</i>             | MA-W2        | <i>Persea americana</i>   | Mexico         | OR016146                     | TEF submitted |

2017). The mechanism of action of essential oils is conferred to the destabilization of fungal and bacterial cells walls and membranes (Pacheco-Hernández *et al.*, 2020). As a consequence, intracellular compounds drain causing cell death by lysis (Eke *et al.*, 2020). It has been reported the antimicrobial action of the methanolic extracts of *Artemisia annua* (Zaker, 2014) and *Larrea tridentata* (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020) against *Fusarium solani* with percentages of inhibition over 50% at 5 mg mL<sup>-1</sup>. Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) reported that the concentration of thyme essential oil with more effectiveness against *Clonostachys rosea* was 2.13 mg mL<sup>-1</sup>, this concentration was lower than that reported in the present study. Interestingly, the essential oil used in this study had the same chemical composition than that reported for the same authors with thymol (43.6%), O-cimene (15.7%) and gamma-terpinene (12.4%) as major compounds (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a).

**Physicochemical characterization of films.** The microstructure obtained by scanning electron

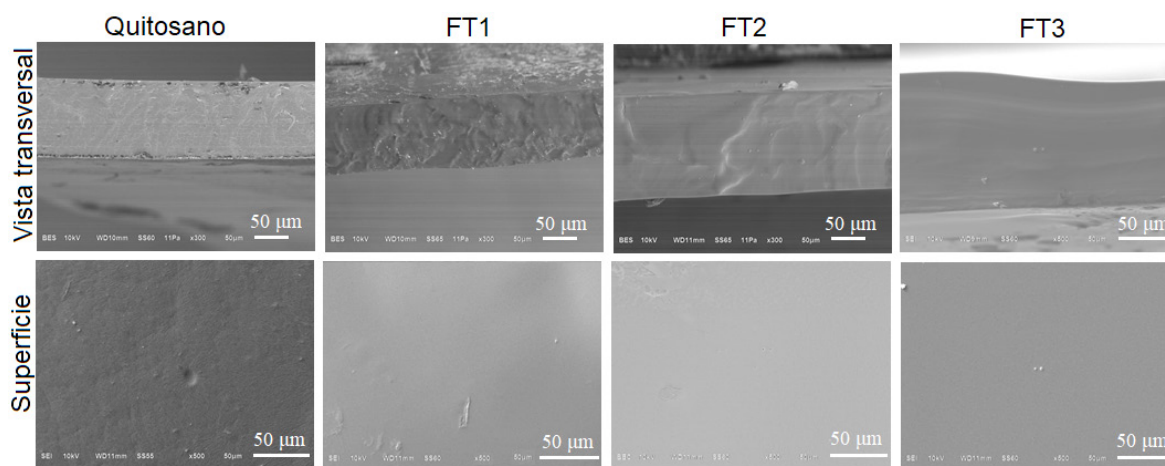
posiciones en el conjunto final de datos. Dichas secuencias se eligieron con base al porcentaje de homología con las secuencias obtenidas para *F. solani* aisladas en la presente investigación.

Las secuencias concatenadas pertenecieron a las accesiones descritas en el Cuadro 2. La mayoría de secuencias homólogas de *Fusarium solani* pertenecieron a aquellas aisladas de *Panax ginseng* provenientes de China.

**Ensayos de evaluación antimicrobiana por microdilución en caldo.** Los resultados del presente estudio demostraron que el aceite esencial de tomillo ejerció una MIC de 4.4 ± 0.04 mg mL<sup>-1</sup> sobre *F. solani*. Se sabe que los aceites esenciales funcionan como agentes antifúngicos naturales, ecológicos, renovables y fácilmente biodegradables para la conservación de muchos alimentos (Pandey *et al.*, 2017). El mecanismo de acción de los aceites esenciales radica en desestabilizar la pared celular y membrana citoplasmática de hongos y bacterias (Pacheco-Hernández *et al.*, 2020). En consecuencia, se genera una fuga de compuestos intracelulares que

microscopy (SEM) revealed that film surface of the chitosan hybrid films obtained in this work was homogenous as those reported to inhibit the growth of *C. rosea* in avocado fruit (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). The presence of pores, bubbles or fractures was not observed (Figure 3), which indicated high miscibility between polymeric matrix and the essential oil. However, small irregularities were

provocan la muerte celular por lisis (Eke *et al.*, 2020). Se ha reportado la acción antimicrobiana de algunos extractos metanólicos de plantas como aquellos de *Artemisia annua* (Zaker, 2014) y *Larrea tridentata* (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020) contra *Fusarium solani* con porcentajes de inhibición superiores al 50% en dosis de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) reportaron la concen-



**Figure 3. Micrographs of scanning electron microscopy for transversal views and surfaces of films elaborated with chitosan and hybrids films supplemented with thyme essential oil (FT1-FT3).**

**Figura 3. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la vista transversal y superficie de las películas elaboradas con quitosano y aquellas suplementadas con aceite esencial de tomillo (FT1-FT3).**

observed in transversal views (Figure 3) but, these did not interfere with their malleability. The addition of essential oils in polymeric matrices requires emulsification and as a result, the dried material does not show signs of lipid accumulation in the surface (Lian *et al.*, 2020; Ardjoum *et al.*, 2023). The same behavior has been observed in other films impregnated with essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*), citronella (*Pelargonium citrodorum*) and thyme (*Thymus vulgaris*) (Haghighi *et al.*, 2019). According to previous studies, the surface of a great variety of hybrid films is often uniform without bubbles, drops, pores or fractures (Haghighi

tración de aceite esencial tomillo evaluada contra *Clonostachys rosea* fue de 2.13 mg mL<sup>-1</sup>, siendo mucho menor. Interesantemente, el aceite usado en este estudio tuvo la misma composición química que la reportada por los mismos autores, siendo el timol (43.6%), O-cimeno (15.7%) y  $\gamma$ -terpineno (12.4%) los compuestos mayoritarios (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a

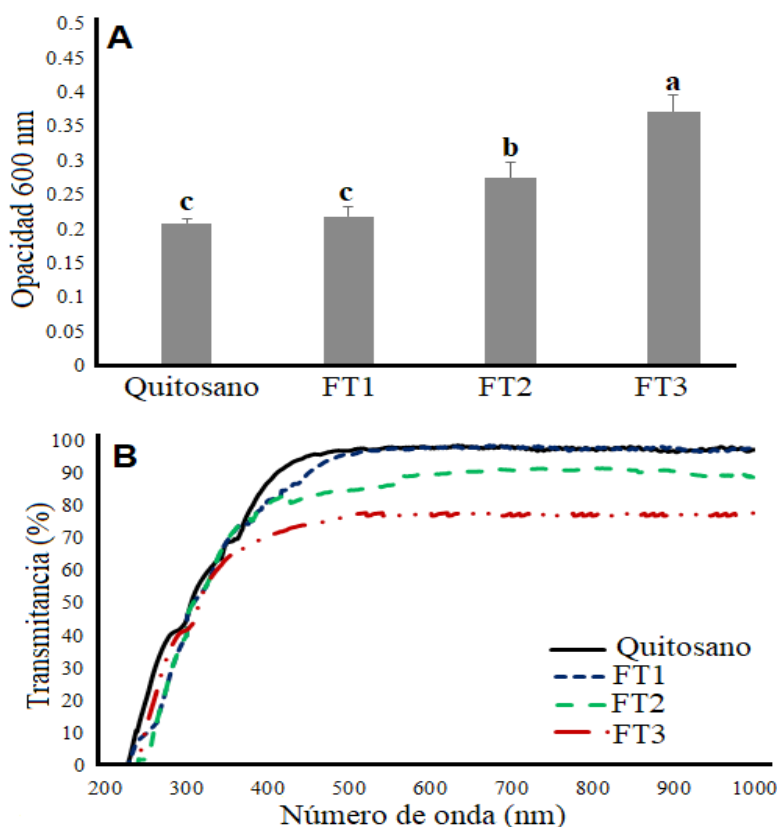
#### **Caracterización fisicoquímica de las películas.**

La microestructura obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló que la superficie de las películas híbridas de quitosano obtenidas en

*et al.*, 2019). Contrastingly, the materials generated in this investigation showed small pores revealed in transversal views, especially in films containing the highest concentration of thyme essential oil such as FT2 and FT3 (Figure 3). These pores may be produced by the volatility of the essential oil during drying process (Lauriano *et al.*, 2017).

The observed transmittance for chitosan films containing 0.7% thyme essential oil showed a similar behavior than that of films made with pure chitosan (Figure 4A). The UV transmittance (190-300 nm) and visible light (350-800) was similar for chitosan films and FT1 films with no statistically

este trabajo, fue uniforme al igual que aquellas reportadas para inhibir el crecimiento de *C. rosea* en fruto de aguacate (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). No se observaron poros, burbujas o grietas (Figura 3), lo cual indicó una alta miscibilidad entre la matriz polimérica y el aceite esencial. Sin embargo, pequeñas irregularidades fueron observadas al corte transversal (Figura 3), mismas que no interfirieron su maleabilidad. La adición de aceites esenciales en matrices poliméricas requiere emulsificación y como resultado, el material seco no presenta gotas de lípidos en la superficie (Lian *et al.*, 2020; Ardjoum *et al.*, 2023). Se ha observado este mismo



**Figure 4.** Transmittance (A) and opacity (B) of chitosan films (without essential oil) and films impregnated with thyme essential oil at concentration of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) and 1.3 % w/v (FT3). Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) according to ANOVA-Tukey ( $n=5$ ).

**Figura 4.** Transmittancia (A) y opacidad (B) de las películas de quitosano puro (sin aceite esencial) y películas impregnadas con aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3 % p/v (FT3). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) de acuerdo a la prueba ANOVA-Tukey ( $n=5$ ).

significant differences. However, statistically significant differences were observed ( $p < 0.01$ ) between films FT2 and FT3 with those made with pure chitosan and FT1 from 400 to 1000 nm (Figure 5). On the contrary, opacity of films FT2 and FT3 showed a clear protective effect against UV light

fenómeno en otras películas impregnadas con aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Pelargonium citrodorum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) (Haghighi *et al.*, 2019). De acuerdo con estudios previos, la superficie de una gran variedad de películas híbridas suele ser uniforme y no

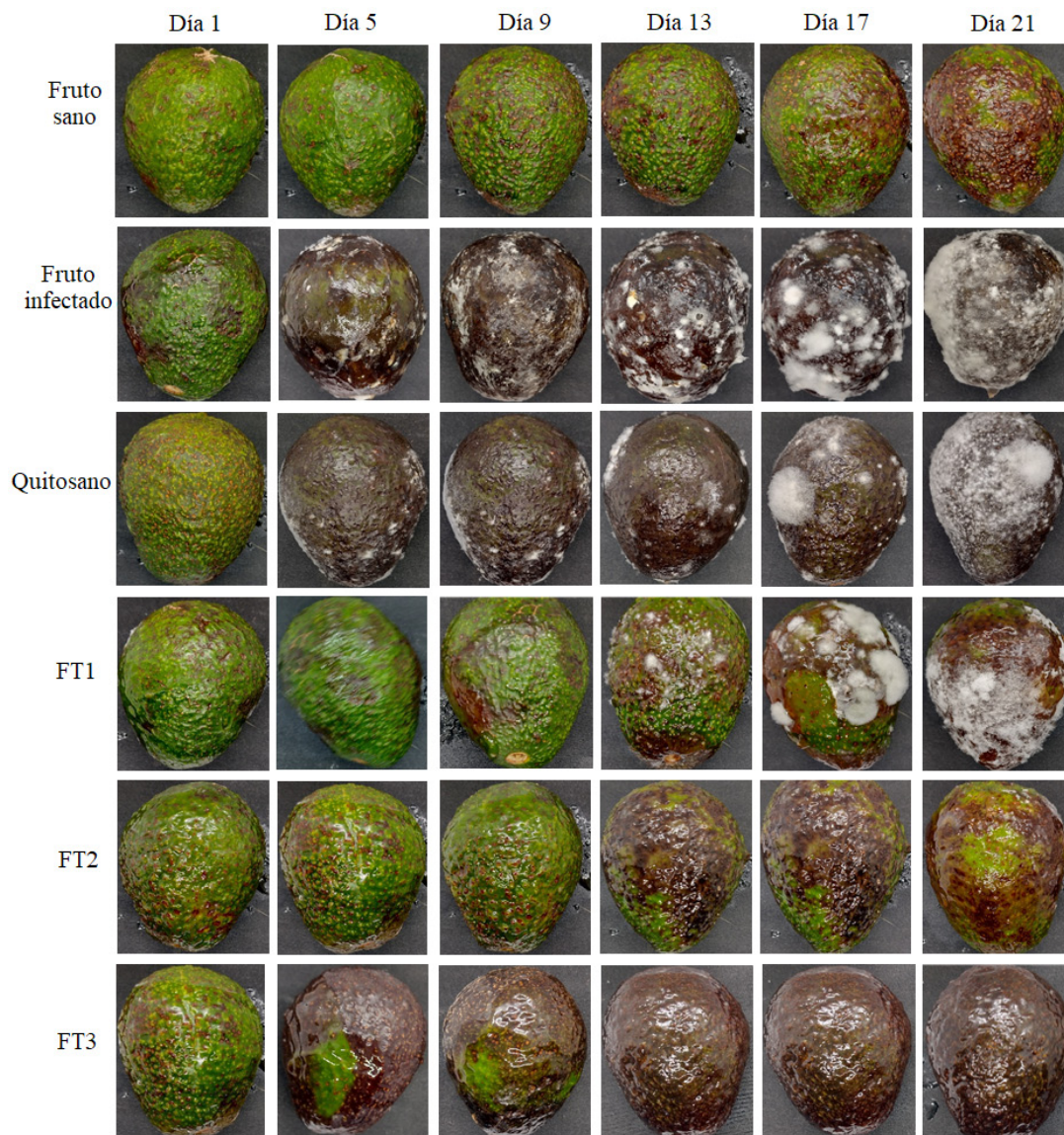


Figure 5. Qualitative kinetics for the colonization of *Fusarium solani* in avocado fruits treated with chitosan films and films impregnated with thyme essential oil at concentrations of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) and 1.3% w/v (FT3) during 21 days.  
 Figura 5. Cinética cualitativa de la colonización de *Fusarium solani* en frutos de aguacate tratados con películas de quitosano y aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% p/v (FT3) durante 21 días.

with statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) in comparison with other films (Figure 4B). In the same context, films made with sole chitosan and FT1 did not show statistically significant differences among them. On the other hand, the thickness of films proportionally increased as the concentration of impregnated essential oil also increased, this trend was in accordance with previous studies performed by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). The thickness of films FT1, FT2 y FT3 was 0.103, 0.208, 0.223 y 0.251 mm respectively, which was reproducible with previous work describing the same type of films (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). Lian *et al.* (2020) created films with diverse polymers (xanthan gum, pullulan, gum tragacanth and gum arabic) supplemented with thyme essential oil for the growth control of *E. coli* in nectarine. Such films also showed an increase in thickness after adding growing concentrations of essential oil. Nevertheless, some studies suggest that the thickness of films supplemented with essential oils is associated with changes in hydrogen bonds as well as with the ionization of amine and carboxylic groups (Lian *et al.*, 2020). As is known, opacity and transmittance act as barriers against UV radiation which induces fast food degradation. High levels of opacity and low transmittance play a vital role to preserve organoleptic properties and to retard lipid oxidation (Romanazzi *et al.*, 2017). The capacity to retract UV light is an important factor to conserve foods since such radiation causes a fast degradation because of associated oxidative stress (Romanazzi *et al.*, 2017).

***In situ* evaluation of chitosan films impregnated with thyme essential oil.** From the four films evaluated, those made by pure chitosan did not exert and inhibitory effect on the growth of *F. solani*. A similar result was observed the Hass avocado fruits infected with *Clonostachys rosea*

presenta burbujas, gotas, poros o grietas (Haghighi *et al.*, 2019). Contrastantemente, los materiales generados en esta investigación muestran pequeños poros al corte transversal, sobre todo en aquellas películas con mayor cantidad de aceite como FT2 y FT3 (Figura 3). Estos poros podrían atribuirse a la volatilidad del aceite esencial durante el secado (Lauriano *et al.*, 2017).

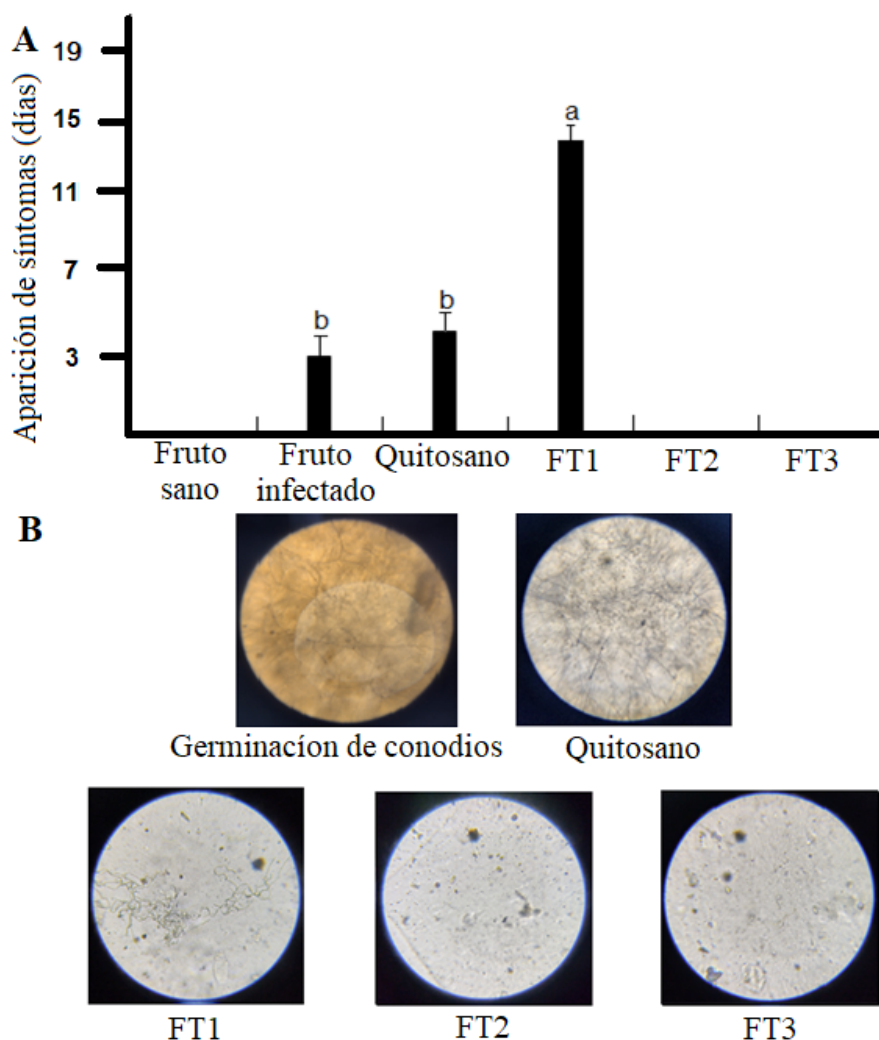
La transmitancia observada para las películas de quitosano que contuvieron 0.7% de aceite esencial de tomillo mostró un comportamiento similar a aquellas de quitosano puro (Figura 4A). La transmitancia UV (190-300 nm) y de luz visible (350-800) fue semejante en las películas de quitosano y FT1 sin diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre las películas FT2 y FT3 con aquellas de quitosano y FT1 a partir de 400-1000 nm (Figura 5). Por el contrario, la opacidad de las películas FT2 y FT3 mostró un claro efecto protector contra la luz UV con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) respecto al resto de las películas (Figura 4B). Así mismo, las películas de quitosano puro y FT1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Por otro lado, el grosor de las películas aumentó con base a la concentración de aceite impregnado concordando con Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). El grosor de las películas de quitosano, FT1, FT2 y FT3 fue de 0.103, 0.208, 0.223 y 0.251 mm respectivamente siendo reproducible con lo reportado previamente para el mismo tipo de películas (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). Lian *et al.* (2020) elaboraron películas con diferentes polímeros (goma xantana, pululano, goma tragacanto y goma arábica) suplementadas con aceite esencial de tomillo para controlar el crecimiento de *E. coli* en nectarina. Dichas películas también mostraron un aumento en grosor al adicionar concentraciones crecientes de aceite esencial. No obstante, algunos

and *Fusarium verticillioides* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). On the other hand, the films FT2 and FT3 showed a clear delay on the growth of *F. solani* until 21 days after treatment (Figure 5). The addition of thyme essential oil to chitosan matrix enhanced the antimicrobial effect, this according to previous results observed in films generated with maize starch on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* (Ardjoum *et al.*, 2023). It has been demonstrated that pectin coatings impregnated with essential oils reduced the amount of microorganisms (lactic bacteria, yeasts and filamentous fungi) in foods of animal origin such as bologna (Gedikoğlu, 2022). In other context, essential oils rich in carvacrol and thymol has been used to improve shelf life of avocado fruit during post-harvest period. These essential oils were extracted from *Thymus daenensis* and *Satureja khuzistanica* and showed high effectiveness against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Sarkhosh *et al.*, 2017).

Avocado fruits treated with hybrid films did not show symptoms of infection whereas non-treated infected fruits were clearly affected since the first three days (Figure 6A). On the other hand, infected avocados simultaneously treated with films made with pure chitosan and FT1 showed symptom of infection from the 5th day (Figure 6A). These results suggested that chitosan itself cannot stop the growth of *F. solani*. Despite this, it has been documented that chitosan damages cell wall and changes cell membrane permeability of filamentous fungi (Romanazzi *et al.*, 2017). The evaluation of conidial germination on the surface of films FT1-FT3 demonstrated an evident viability loss, suggesting that coatings with higher amount of thyme essential oil are more effective to be preferentially used as preventive agents (Figure 6B). The results of this investigation suggested that thyme essential oil impregnated in chitosan films

estudios sugieren que el grosor de las películas suplementadas con aceites esenciales está asociado con los cambios de los enlaces de hidrógeno, así como con la ionización de los grupos amino o carboxilo (Lian *et al.*, 2020). Como es sabido, la opacidad y transmitancia cumplen la función de una barrera contra la radiación UV, misma que provoca una degradación rápida de los alimentos. Altos niveles de opacidad y baja transmitancia son clave para preservar las propiedades organolépticas y retardar la oxidación de lípidos (Romanazzi *et al.*, 2017). La capacidad de repeler la luz UV es un factor importante en la conservación de alimentos ya que dicha radiación causa una rápida degradación debido al estrés oxidativo que genera (Romanazzi *et al.*, 2017).

**Evaluación *in situ* de películas de quitosano impregnadas con aceite esencial de tomillo.** De las cuatro películas evaluadas, las de quitosano puro no ejercieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. solani*. Un resultado similar fue observado en fruto de aguacate Hass infectado con *Clonostachys rosea* y *Fusarium verticillioides* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Por otro lado, las películas FT2 y FT3 mostraron un claro retraso en el crecimiento de *F. solani* hasta 21 días post-tratamiento (Figura 5). La adición de aceite esencial de tomillo a la matriz de quitosano potencializa el efecto antimicrobiano, esto de acuerdo con resultados previos observados en películas elaboradas con almidón de maíz sobre *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Ardjoum *et al.*, 2023). Se ha demostrado que recubrimientos de pectina impregnados con aceites esenciales reducen el recuento de microorganismos (bacterias lácticas, levaduras y mohos) en alimentos de origen animal como las mortadelas (Gedikoğlu, 2022). Por otro lado, se han evaluado diversos aceites esenciales ricos en carvacrol y timol para mejorar la vida útil poscosecha



**Figure 6.** Kinetics for symptom appearance during *in situ* inoculation of *Fusarium solani* on avocado fruits (A). Evaluation of conidial viability of *F. solani* on the surface of films FT1-FT3 (B). Means (n=25) with different letter indicate statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) by ANOVA-Tukey.

**Figura 6.** Cinética de aparición de síntomas de infección tras la inoculación *in situ* de *Fusarium solani* en frutos de aguacate (A). Evaluación de la viabilidad de conidios de *F. solani* sobre la superficie de las películas FT1-FT3 (B). Medias (n=25) con letra distinta indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) por ANOVA-Tukey.

causes a substantial delay in the growth of *F. solani* at least for 21 days. However, residual protective effect may be extended to 30 days in accordance with documented observations (data no shown).

**Firmness of avocado fruits.** The firmness of non-treated avocado fruits was notably reduced

de aguacate. Estos aceites esenciales fueron extraídos de *Thymus daenensis* y *Satureja khuzistanica* y mostraron alta efectividad contra la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Sarkhosh *et al.*, 2017).

Los frutos de aguacate tratados con los recubrimientos no mostraron síntomas de infección

(69.5%) en 21 días. At the same time, healthy avocados showed loss of turgor 19.5 al 26.6% (Figure 7). The films FT1, FT2 and FT3 kept the firmness of avocado fruits ( $p < 0.01$ ) until days 21 compared with both healthy and infected avocados. Thymol (as major volatile in thyme essential oil) is a phenolic monoterpene which causes physical damage changing permeability of cell membrane (Sarkhosh *et al.*, 2017). The results of statistical analysis revealed statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) between the firmness of healthy avocados and those covered with the films FT2 y FT3. Thus, avocados treated with films made with pure chitosan showed 13% loss related with healthy non-treated avocados. These evidences suggested that chitosan does not exert a prolonged fungistatic activity on *F.*

mientras que los frutos infectados no tratados fueron afectados desde los primeros tres días (Figura 6A). Por otro lado, los aguacates infectados, tratados con las películas de quitosano y FT1 presentaron crecimiento desde el día 5 (Figura 6A). Estos resultados sugieren que el quitosano por sí mismo no controla el crecimiento de *F. solani*. A pesar de esto, se tiene documentado que el quitosano daña la pared celular y altera la permeabilidad de la membrana celular de hongos filamentosos (Romanazzi *et al.*, 2017). La evaluación de la germinación de conidios sobre la superficie de las películas FT1-FT3 demostró una clara pérdida en su viabilidad, sugiriendo que las superficies que contuvieron mayor cantidad de aceite de tomillo son más efectivas y podrían ser usadas preferentemente como agentes

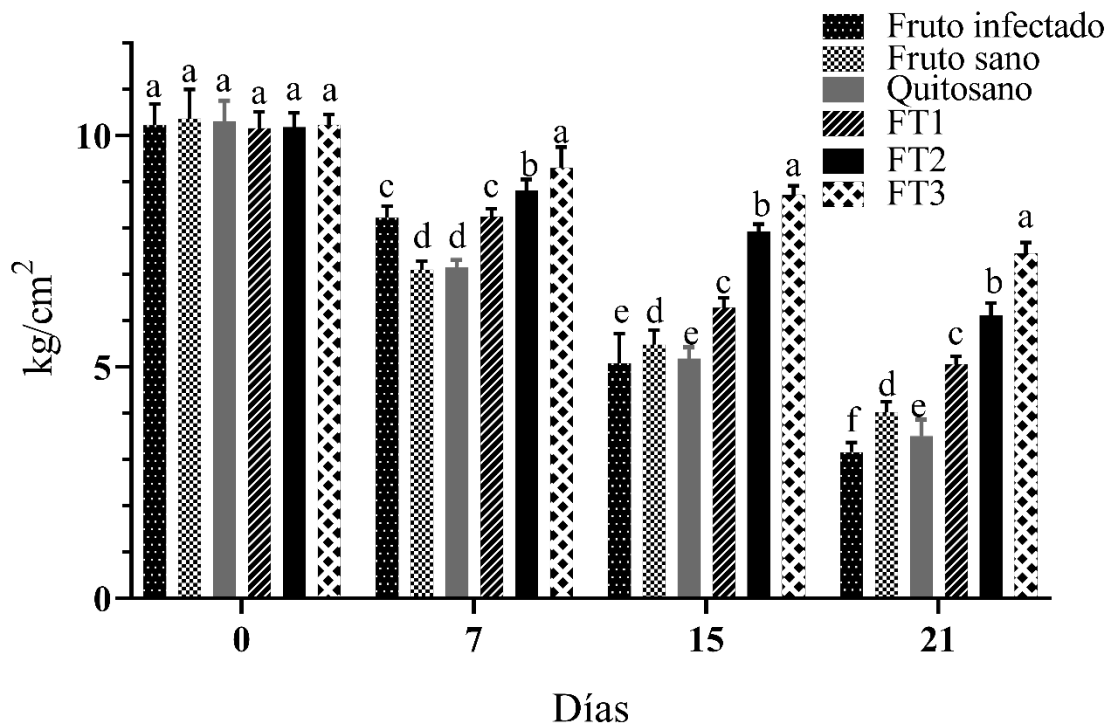


Figure 7. Firmness of avocado fruits treated with hybrid films FT1-FT3. Means with divergent letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) by ANOVA-Tukey (n=25).

Figura 7. Firmeza de aguacates tratados con las películas híbridas FT1-FT3. Medias con letras divergentes, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) por ANOVA-Tukey (n=25).



*solani*. It has been reported that the application of the essential oils from thyme and savory (*Satureja montana*) keep the firmness of avocado fruits better than those of mentha (*Mentha piperita*), cinnamon (*Cinnamomum verum*) or lavender (*Lavandula angustifolia*) during storage (Sarkhosh *et al.*, 2017). Previous studies performed by our research group, indicates that loss of firmness in avocado fruit harvested in the northeastern highlands of Puebla, is mainly affected by *Clonostachys rosea* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). The loss of firmness can be attributed to the degradation of cell wall components (pectins) by the action of fungal pectinesterases and polygalacturonases (Huber *et al.*, 2001). Loss of turgor was translated into water deficit in plant tissues causing changes in vegetal texture (Bello *et al.*, 2016). Firmness is a very important parameter in the quality of perishable fruits and new techniques for their conservation represent an area of opportunity that must be addressed with special interest (Jha *et al.*, 2012; Pedreschi *et al.*, 2019).

**Parameters of nutritional and nutraceutical quality.** Avocados infected with *F. solani* showed a dramatic reduction in the content of fat ( $1.36 \pm 0.4$  g/100 g) at day 21 compared with healthy fruits (Figure 8). On the contrary, avocados treated with films FT2 y FT3 presented marked differences at day 21 ( $p < 0.01$ ) compared with infected fruits. However, fruits treated with films made with pure chitosan and FT1 did not show statistically significant differences in relation to infected fruits but, they showed differences with healthy fruits. Regarding the content of total fat, infected avocados had 60% reduction at day 21 in comparison with healthy fruits. Similarly, protein levels showed 49% decrease in avocados infected by *F. solani* at day 21 in comparison with healthy avocados ( $p < 0.01$ ). It was also observed that infected fruits and

preventivos (Figura 6B). Los resultados de esta investigación sugieren que el aceite esencial de tomillo impregnado en películas de quitosano, retrasa de manera sustancial el crecimiento de *Fusarium solani* al menos por 21 días. Sin embargo, el efecto residual podría incluir hasta 30 días de protección de acuerdo a observaciones documentadas (datos no mostrados).

**Firmeza de frutos de aguacate.** Los frutos infectados disminuyeron notablemente su firmeza (69.5%) en 21 días. En el mismo tiempo, los aguacates sanos mostraron una pérdida de turgencia del 19.5 al 26.6% (Figura 7). Las películas FT1, FT2 y FT3 conservaron significativamente la firmeza de los aguacates ( $p < 0.01$ ) al día 21 en comparación con aguacates infectados y sanos. El timol (como volátil mayoritario del aceite esencial de tomillo) es un monoterpeneoide fenólico que causa daño físico a los hongos cambiando la permeabilidad de la membrana celular (Sarkhosh *et al.*, 2017). Los resultados del análisis estadístico revelaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) en la firmeza de aguacates sanos y aquellos cubiertos con las películas FT2 y FT3. Así mismo, los aguacates tratados con las películas de quitosano puro presentaron una pérdida mayor al 13% en relación con aguacates sanos no tratados. Estas evidencias reforzaron el hecho de que el quitosano no ejerce una actividad fungistática prolongada sobre *F. solani*. Se ha reportado que la aplicación de aceite esencial de tomillo y ajedrea (*Satureja montana*) mantiene la firmeza de frutos de aguacate en comparación con los aceites de menta (*Mentha piperita*), canela (*Cinnamomum verum*) o lavanda (*Lavandula angustifolia*) durante el almacenamiento (Sarkhosh *et al.*, 2017). Estudios previos efectuados por nuestro grupo de investigación, indican que la pérdida de firmeza en fruto de aguacate Hass cosechados en la sierra nororiental

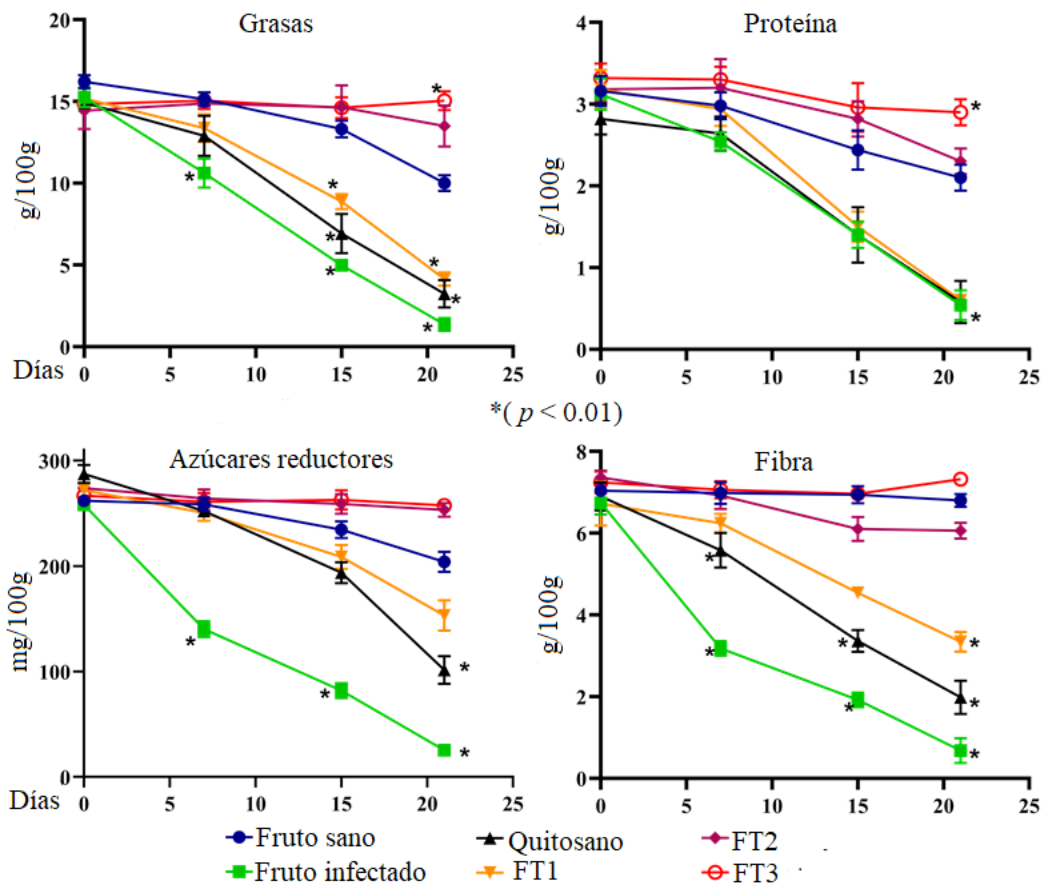


Figure 8. Fat content, protein, reducing sugars and fiber of Hass avocado fruits treated with hybrid films impregnated with thyme essential oil at concentrations of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% w/v (FT3) during 21 days. Asterisks indicate means ( $n=25$ ) with statistically significant differences by ANOVA-Tukey ( $p < 0.01$ ).

Figura 8. Contenido de grasas, proteínas, azúcares reductores y fibra en frutos de aguacates Hass tratados con las películas híbridas impregnadas con aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% p/v (FT3) durante 21 días. Los asteriscos indican medias ( $n=25$ ) con diferencias estadísticamente significativas sobre ANOVA-Tukey ( $p < 0.01$ ).

those treated with films made of pure chitosan and FT1 did not show statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) among them at day 21. However, avocados treated with film FT3 showed statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) in comparison with healthy and infected avocados. On the other hand, avocados treated with films FT2 and FT3 preserved up to 37% protein content at day 21 compared to healthy fruits. Contrarily, reducing

del estado de Puebla, es mayormente afectada por *Clonostachys rosea* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). La pérdida de firmeza puede atribuirse a la degradación de los componentes de la pared celular (pectinas) por la acción de pectinesterasas y poligalacturonasas fúngicas (Huber *et al.*, 2001). La pérdida de turgencia se traduce en un déficit de agua en los tejidos vegetales provocando cambios en la textura vegetal (Bello *et al.*, 2016). La firmeza

sugars decreased up to 90% in infected fruits at day 21 compared with healthy fruits. This fact may be related with the parasitic activity of the filamentous fungi which uses reducing sugars as a carbon source. In addition, infected avocados previously treated with films FT2-FT3 showed statistically significant differences at day 21 if compared with healthy avocados ( $p < 0.01$ ). In the same context, fiber content was reduced until 90% in infected avocados at day 21 in comparison with healthy fruits. Treatments of pure chitosan and FT1 showed statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) at day 21 compared with healthy avocados since losses of 70 y 21%, were respectively recorded. Treatments FT2 and FT3 efficiently maintained fiber content but, no statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) were observed among these treatments and healthy avocados.

Avocado fruit contains nutrients that favor human diet because of the high amount of protein (4%), but especially it is pretty valued because of the high amount of beneficial fat (30%) (Selladurai y Madhav, 2020). Thus, fatty acid content plays a crucial role to ameliorate the risk of cardiovascular diseases (Krumreich *et al.*, 2018).

The decrease in reducing sugar content was inversely proportional to the accumulation of fatty acids. This evidence could be related to the overexpression of genes associated to glycolysis as a potential source of pyruvate for fatty acid biosynthesis through the excretion of citrate to the cytoplasm (Pedreschi *et al.*, 2019). Determination of linoleic acid in infected fruits revealed that *F. solani* was able to drastically decrease its accumulation at day 21 in comparison with healthy fruits (Figure 9). Such decrease was evident in infected avocados during normal ripening and suggested that *F. solani* is able to metabolize fatty acids as a substrate for its development (Pedreschi *et al.* 2019; Bowen *et al.*, 2018). Contrarily, avocados treated with films

es un parámetro muy importante en la calidad de frutos percederos y las técnicas que favorecen su conservación representan un área de oportunidad que debe ser abordada con especial interés (Jha *et al.*, 2012; Pedreschi *et al.*, 2019).

**Parámetros de calidad nutricional y nutracéutica.** Los aguacates infectados con *F. solani* mostraron una dramática reducción en la cantidad de grasa ( $1.36 \pm 0.4$  g/100 g) al día 21 en comparación con frutos sanos (Figura 8). Por lo contrario, los aguacates tratados con las películas FT2 y FT3 presentaron diferencias estadísticamente significativas al día 21 ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo de aguacates infectados. Sin embargo, aquellos frutos tratados con las películas de quitosano puro y FT1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación a los frutos infectados, pero si con los frutos sanos. Respecto al contenido de grasa total, los aguacates infectados tuvieron una reducción de más del 60% al día 21 en relación a frutos sanos. De igual forma, la cantidad de proteína disminuyó 49% en aguacates infectados por *F. solani* al día 21 en comparación con aguacates sanos ( $p < 0.01$ ). También se observó que los aguacates infectados, así como aquellos tratados con películas de quitosano puro y FT1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre ellos al día 21. Sin embargo, los aguacates tratados con las películas FT3 mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) en comparación con los aguacates sanos e infectados. Por otro lado, los aguacates tratados con las películas FT2 y FT3 preservaron hasta un 37% más el contenido de proteínas al día 21 en comparación con frutos sanos. Contrariamente, los azúcares reductores disminuyeron hasta un 90% en frutos infectados al día 21 en comparación con frutos sanos. Este hecho podría estar relacionado con la actividad parasítica del hongo filamentoso al usar azúcares

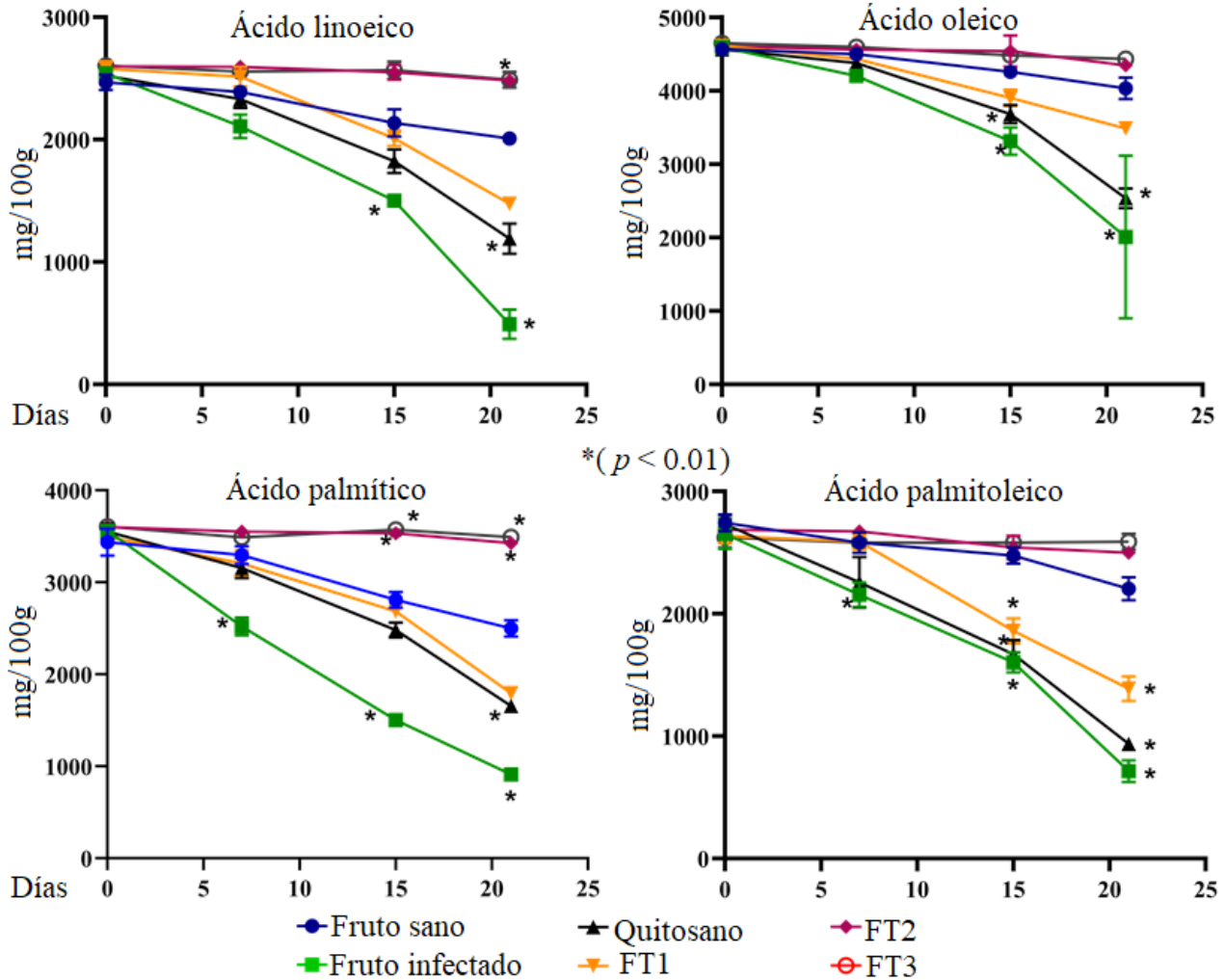


Figure 9. Contents of linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and palmitoleic acid in Hass avocado fruits treated with hybrid films impregnated with thyme essential oil at concentrations of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) and 1.3% w/v (FT3) during 21 days. Asterisks indicate means with statistically significant differences by ANOVA-Tukey ( $p < 0.01$ ).

Figura 9. Contenido de ácido linoleico, oleico, palmítico y palmitoleico en frutos de aguacates Hass tratados con las películas híbridas impregnadas con aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% p/v (FT3) durante 21 días. Los asteriscos indican medias ( $n=25$ ) con diferencias estadísticamente significativas por ANOVA-Tukey ( $p < 0.01$ ).

FT3 showed statistically significant differences at day 21 ( $p < 0.01$ ) in comparison with healthy fruits. Infected fruits and those treated with films made of pure chitosan did not show statistically significant differences among them but, they show differences

reductores como fuente de carbono. En adición, al día 21 los aguacates infectados previamente tratados con las películas FT2-FT3 presentaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de azúcares en comparación con aguacates sanos

with healthy fruits at day 21. The content of oleic acid in infected fruits has a reduction of 70% at day 21 showing statistically significant differences ( $p < 0.01$ ). Villa *et al.* (2011) reported oleic acid as the main fatty acid in Hass avocado with rates of 67-70% of total lipid composition. These authors observed a significant increase of monounsaturated and saturated fatty acids during normal avocado ripening. Contrarily, these authors concluded that polyunsaturated fatty acids decreased. Infected avocados treated with chitosan films showed statistically significant differences compared with healthy avocados at day 21. Nevertheless, avocados treated with films FT3 did not show statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) compared with healthy avocados at day 21.

Conversely, palmitic acid decreased 63.5% in infected fruits whereas avocados treated with chitosan films presented statistically significant differences in comparison with healthy avocados ( $p < 0.01$ ). In the same context, avocados treated with films FT1 and FT2 showed statistically significant differences compared with healthy fruits because of their ability to preserve the content of this fatty acid in around 37.1 y 40%. Finally, the content of palmitoleic acid in infected fruits decreased until 67.6% in comparison with healthy fruits. Treatments of pure chitosan and FT1 showed statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) at day 21 in comparison with healthy for this fatty acid, whereas treatments FT2 and FT3 kept the content of palmitoleic acid without statistically significant differences with healthy avocados. Pedreschi *et al.* (2019) claim that the concentration of palmitic and palmitoleic acids in avocados usually increases between 65 day 105 days in intact plants. The results of this investigation suggest that during a period of 21 days, the levels of these fatty acids remain steady, however, longer time is required to corroborate the findings of Pedreschi *et al.* (2019).

( $p < 0.01$ ). Así mismo, el contenido de fibra en aguacates infectados se redujo hasta un 90% al día 21 en comparación a frutos sanos. Los tratamientos con quitosano y FT1 presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) al día 21 respecto a los aguacates sanos ya que existió una pérdida del 70 y 21%, respectivamente. Los tratamientos FT2 y FT3 mantuvieron eficientemente el contenido de fibra, pero entre estos tratamientos no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) en comparación con aguacates sanos.

El fruto de aguacate contiene nutrientes que favorecen la dieta humana debido a la alta cantidad de proteínas (4%), pero sobre todo es altamente valuado por la cantidad de grasas benéficas (30%) (Selladurai y Madhav, 2020). Aunado a ello, el contenido de ácidos grasos juega un papel muy importante para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Krumreich *et al.*, 2018).

El decremento en el contenido de azúcares reductores fue inversamente proporcional al incremento en la producción de ácidos grasos. Esto podría estar relacionado a la sobreexpresión de genes asociados a la glucólisis como fuente potencial de piruvato para la síntesis de ácidos grasos por medio de la excreción de citrato hacia el citosol (Pedreschi *et al.*, 2019). La determinación de los niveles del ácido linoleico en frutos infectados reveló que *F. solani* disminuyó drásticamente su contenido al día 21 respecto a frutos sanos (Figura 9). Tal disminución fue evidente en aguacates infectados durante la maduración y sugiere que *F. solani* podría metabolizar ácidos grasos como sustrato para su desarrollo (Pedreschi *et al.* 2019; Bowen *et al.*, 2018). Por lo contrario, los aguacates que fueron tratados con las películas FT3 presentaron diferencias estadísticamente significativas al día 21 ( $p < 0.01$ ) respecto a los aguacates sanos. Los frutos infectados y aquellos tratados con las películas de quitosano no presentaron diferencias

## CONCLUSIONS

The films generated in this investigation showed fungistatic activity against a native strain of *Fusarium solani* isolated from Hass avocado fruits harvested in the northeastern highlands of Puebla. The addition of thyme essential oil in chitosan films improved physicochemical and biological properties in these films. Remarkably, the films made of pure chitosan did not stop the normal growth of the fungus under the experimental conditions reported in this work. It was observed that transmittance and opacity were substantially improved by the addition of thyme essential oil. The fungistatic films obtained in this investigation delayed the normal growth of the fungus and preserved nutrimental and nutraceutical contents of Hass avocado fruit up to 21 days. These results suggested the possible use of these films in avocado fruits to reduce the incidence of *F. solani* during postharvest period.

## CITED LITERATURE

- AOAC. 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International. 21st ed. AOAC International; Gaithersburg, MA, USA.
- Ardjoun N, Chibani N, Shankar S, Salmieri S, Djidjelli H and Lacroix M. 2023. Incorporation of *Thymus vulgaris* essential oil and ethanolic extract of propolis improved the antibacterial, barrier and mechanical properties of corn starch-based films. *International Journal of Biological Macromolecules* 224: 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.146>.
- Bello LJE, Balois MR, Sumaya MMT, Juárez LP, Jiménez REI, Sánchez HLM, López G GG and García PJD. 2016. Biopolímeros de mucilago, pectina de nopalitos y quitosano, como recubrimiento en almacenamiento y vida de anaquel de frutos de aguacate Hass. *Acta Agrícola y Pecuaria* 2(2): 43-50. <http://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/24>
- Bowen J, Billing D, Connolly P, Smith W, Cooney J and Burdon J. 2018. Maturity, storage and ripening effects on anti-fungal compounds in the skin of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology* 146(1): 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.005>

estadísticamente significativas entre sí, pero si en contraste con frutos sanos al día 21. El contenido de ácido oleico en aguacates infectados tuvo una reducción del 70% al 21 siendo altamente significativa ( $p < 0.01$ ). Villa *et al.* (2011) reportaron al ácido oleico como el principal ácido graso en el aguacate Hass ya que conforma entre el 67-70% del total de su composición lipídica. Los autores observaron un aumento significativo de ácidos grasos monoinsaturados y saturados durante la maduración del aguacate. Contrariamente, concluyeron que el contenido de ácidos grasos poli-insaturados disminuyó. Los aguacates infectados con películas de quitosano presentaron diferencias estadísticamente significativas al día 21 en referencia a los aguacates sanos. Sin embargo, los aguacates tratados con las películas FT3 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) en comparación con los aguacates sanos al día 21.

Por otra parte, el ácido palmítico disminuyó 63.5% en frutos infectados mientras que aquellos tratados con películas de quitosano presentaron diferencias estadísticamente significativas en contraste con los aguacates sanos ( $p < 0.01$ ). De la misma forma, los aguacates tratados con las películas FT1 y FT2 presentaron diferencias estadísticamente significativas en referencia a los aguacates sanos ya que preservaron el contenido de este ácido graso entre un 37.1 y 40%. Finalmente, el contenido de ácido palmitoleico en aguacates infectados se redujo hasta un 67.6% respecto a aguacates sanos. Los tratamientos con quitosano y FT1 presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) al día 21 respecto a los aguacates sanos para este ácido graso, mientras que los tratamientos FT2 y FT3 mantuvieron el contenido de ácido palmitoleico sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en referencia a los aguacates sanos. Pedreschi *et al.* (2019) sostienen que la concentración de los ácidos palmítico y palmitoleico en aguacates usualmente

- Coyotl-Pérez WA, Rubio-Rosas E, Morales-Rabanales QN, Ramírez-García SA, Pacheco-Hernández Y, Pérez-España VH, Romero-Arenas O and Villa-Ruano N. 2022a. Improving the shelf life of avocado fruit against *Clonostachys rosea* with chitosan hybrid films containing thyme essential oil. *Polymers* 14(10): 2050. <https://doi.org/10.3390/polym14102050>
- Coyotl-Pérez WA, Morales-Rabanales QN, Lozoya-Gloria E, Becerra-Martínez E, Ramírez-García SA, Mosso-González C and Villa-Ruano N. 2022b. Fungistatic films containing cinnamon essential oil: new coatings to preserve the nutraceutical content of avocado fruit against fusariosis. *Chemistry and Biodiversity* 19(8): e202200441. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200441>
- Dugassa A, Alemu T and Woldehawariat Y. 2021. In-vitro compatibility assay of indigenous *Trichoderma* and *Pseudomonas* species and their antagonistic activities against black root rot disease (*Fusarium solani*) of faba bean (*Vicia faba* L.). *BMC Microbiology* 21(1): 115. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02181-7>
- Eke P, Adamou S, Fokom R, Dinango NV, Tsouh FPV, Wakam LN, Nwaga D and Fekam BF. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi alter antifungal potential of lemongrass essential oil against *Fusarium solani*, causing root rot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heliyon* 6(12): e05737. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05737>
- Fernández VD, Bautista BS, Fernández VD, Ocampo RA, García PA and Falcón RA. 2015. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 24(3): 52-57. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2071-00542015000300008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542015000300008)
- Gedikoğlu A. 2022. The effect of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and/or extracts in pectin edible coating on the preservation of sliced bolognas. *Meat Science* 184: 108697. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108697>
- Haghighi H, Biard S, Bigi F, De Leo R, Bedin E, Pfeifer F, Heinz WS, Licciardello F and Pulvirenti A. 2019. Comprehensive characterization of active chitosan-gelatin blend films enriched with different essential oils. *Food Hydrocolloids* 95:33-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.019>
- Hernández-Medina CA, Henao-Henao ED, Velasco-Belalcázar ML and Gómez-López ED. 2015. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Fusarium* asociadas aguacate (*Persea americana* Mill), en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana* 39(2): 51-56. [https://www.researchgate.net/publication/309662918\\_CHARACTERIZACION\\_MORFOLOGICA\\_Y\\_MOLECULAR\\_DE\\_AISLADOS\\_DE\\_Fusarium\\_ASOCIADAS\\_AGUACATE\\_Persea\\_american\\_Mill\\_EN\\_EL\\_VALLE\\_DEL\\_CAUCA](https://www.researchgate.net/publication/309662918_CHARACTERIZACION_MORFOLOGICA_Y_MOLECULAR_DE_AISLADOS_DE_Fusarium_ASOCIADAS_AGUACATE_Persea_american_Mill_EN_EL_VALLE_DEL_CAUCA)

aumenta entre 65 a 105 días en plantas intactas. Los resultados de esta investigación sugieren que durante un periodo de 21 días los niveles de estos ácidos grasos son estables, sin embargo, se requiere una ventana mayor de tiempo para corroborar los hallazgos de Pedreschi *et al.* (2019).

## CONCLUSIONES

Las películas generadas en esta investigación mostraron actividad fungistática contra una cepa nativa de *Fusarium solani* aislada de aguacate Hass proveniente de la Sierra Nororiental del estado de Puebla. La adición del aceite esencial de tomillo en combinación con quitosano resultó en una mejora de las propiedades biológicas y fisicoquímicas en dichas películas. Remarcablemente, las películas de quitosano puro no detuvieron el crecimiento del hongo bajo las condiciones experimentales de este trabajo. Se observó que la transmitancia y opacidad mejoraron sustancialmente con la adición del aceite esencial de tomillo. Las películas fungistáticas obtenidas en esta investigación retrasaron el crecimiento del hongo y preservaron las propiedades nutrimentales y nutracéuticas en fruto de aguacates Hass por 21 días. Estos resultados sugieren la posible utilización de estas películas en frutos de aguacate para reducir la incidencia de *F. solani* durante la poscosecha.

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

- Huber DJ, Kaarkurt Y and Jeon J. 2001. Delay of avocado (*Persea americana*) fruit ripening by 1-methylcyclopropene and wax treatments. *Postharvest Biology and Technology* 28: 171-175. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00176-X)
- Jha SN, Jaiswal P, Narsaiah K, Gupta M, Bhardwaj R and Singh AK. 2012. Non-destructive prediction of sweetness of intact mango using near infrared spectroscopy. *Scientia Horticulture* 138: 171-175. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0033-1>

- Kong W, Huo H, Gu Y, Cao Y, Wang J, Liang J and Niu S. 2022. Antifungal activity of camphor against four phytopathogens of *Fusarium*. South African Journal of Botany 148: 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.019>
- Krumreich FD, Borges CD, Mendonça CRB, Jansen-Alves C and Zambiasi RC. 2018. Bioactive compounds and quality parameters of avocado oil obtained by different processes. Food Chemistry 257(1): 376-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.048>
- Lauriano SVG, Fernando AL, Afonso PJR, Freitas RP, Lopes AA S and Braz FFM. 2017. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. Industrial Crops and Products 107: 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056>
- Lian H, Shi J, Zhang X and Peng Y. 2020. Effect of the added polysaccharide on the release of thyme essential oil and structure properties of chitosan based film. Food Packaging and Shelf Life 23: 100467. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100467>
- Liu Y, Liu S, Luo X, Wu X, Ren J, Huang X, Feng S, Lin X, Ren M and Dong P. 2022. Antifungal activity and mechanism of thymol against *Fusarium oxysporum*, a pathogen of potato dry rot, and its potential application. Postharvest Biology and Technology 192: 112025. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112025>
- Mejía-Bautista M A, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez J M and Reyes-Ramírez A. 2016. *In vitro* activity of *Bacillus* spp. on mycelial growth inhibition of *Fusarium equiseti* and *Fusarium solani* isolated from habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). Agrociencia 50(3): 1123-1135. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952016000801123&script=sci_arttext&tlng=en
- Morales-Rabanales Q N, Cóyotl-Pérez W A, Rubio-Rosas E, Cortes-Ramírez G S, Sánchez-Ramírez J F, Villa-Ruano N. 2022. Antifungal properties of hybrid films containing the essential oil of *Schinus molle*: protective effect against postharvest rot of tomato. Food Control 134: 108766. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108766>
- Pandey A K, Kumar P, Singh P, Tripathi N N and Bajpai V K. 2017. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. Frontiers in Microbiology 7: 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Pandey A K, Deka B, Varshney R, Chepkirui C E and Babu A. 2021. Do the beneficial fungi manage phytosanitary problems in the tea agro-ecosystem? BioControl 66: 445-462. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10084-9>
- Pacheco-Hernández Y, Sánchez-Hernández GR, Reyes-Cervantes E, Romero-Hernández O, Pérez-Xochipa I and Villa-Ruano N. 2020. Chemical variation and pharmacological properties of *Dyssodia decipiens* essential oil. Chemistry and Biodiversity 17(10): e2000487. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000487>
- Pedreschi R, Uarrotta V, Fuentealba C, Alvaro JE, Olmedo P, Defilippi BG and Campos V R. 2019. Primary metabolism in avocado fruit. Frontiers in Plant Science 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00795>
- Ramírez-Gil JG, Henao-Rojas JC and Morales-Ororio JC. 2021. Postharvest diseases and disorders in avocado cv. Hass and their relationship to preharvest management practices. Heliyon 7(1): e05905. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05905>
- Ramos-Aguilar AL, Ornelas-Paz J, Tapia-Vargas LM, Gardea-Béjar AA, Elhadi MY, Ornelas-Paz JJ, Ruiz-Cruz S, Rios-Velasco C and Ibarra-Junquera V. 2021. Comparative study on the phytochemical and nutrient composition of ripe fruit of Hass and Hass type avocado cultivars. Journal of Food Composition and Analysis 97: 103796. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103796>
- Rivedal HM, Stone AG, Severns PM and Johnson KB. 2020. Characterization of the fungal community associated with root, crown, and vascular symptoms in an undiagnosed yield decline of winter squash. Phytobiomes Journal 4: 178-192. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-11-18-0056-R>
- Rodríguez-Castro A, Torres-Herrera S, Domínguez-Calleros A, Romero-García A and Silva-Flores M. 2020. Extractos vegetales para el control de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, una alternativa sostenible para la agricultura. Abanico Agroforestal 2: 1-13. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.7>
- Romanazzi G, Feliziani E, Baños SB and Sivakumar D. 2017. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57(3): 579-601. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>
- Romero-Arenas O, Pérez-Vázquez MAK, Rivera TJA, Pacheco-Hernández Y, Ramírez-García SA, Landeta-Cortés G and Villa-Ruano N. 2022. Volatiles of *Zanthoxylum limoncello* as antifungal agents against the postharvest rot of manzano pepper triggered by *Fusarium temperatum*. Horticulturae 8(8): 700. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080700>
- Sarkhosh A, Vargas AI, Schaffer B, Palmateer AJ, Lopez P, Soleymani A and Farzaneh M. 2017. Postharvest management of anthracnose in avocado (*Persea americana* Mill.) fruit with plant-extracted oils. Food Packaging and Shelf Life 12: 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.02.001>
- Scheel CM, Hurst S F, Barreiros G, Akiti T, Nucci M and Balajee S. A. 2013. Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. BMC Infectious Diseases 13(49): 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-49>
- Selladurai R and Madhav AC. 2020. Nutrient management for avocado (*Persea americana* Miller), Journal of Plant Nutrition 43(1): 138-147. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659322>
- Villa RJA, Molina CFJ, Ayala ZJF, Olivas GI and González AGA. 2011. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado.

- Food Research International 44: 1231-1237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>
- Wanjiku EK, Waceke JW, Wanjala BW and Mbaka JN. 2020. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem end rots of avocado fruits in Kenya. International Journal of Microbiology 4063697: 8. <https://doi.org/10.1155/2020/4063697>
- Yan D, Li Y, Liu Y, Li N, Zhang X and Yan C. 2021. Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections. Molecules 26(23): 7136. <https://doi.org/10.3390/molecules26237136>
- Zaker M. 2014. Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Agriculture and Biosciences 3(4): 190-195. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143326583>

Alternatives for the gray mold (*Botrytis cinerea*) control in cape gooseberry (*Physalis peruviana*) crop

Alternativas para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*)

Yimmy Alexander Zapata-Narváez*, Andrés Díaz-García, Camilo Rubén Beltrán-Acosta, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Agrosavia. Centro de Investigación Tibaitatá - Km 14 Vía Mosquera, Cundinamarca-Colombia.

*Corresponding author: jzapatan@agrosavia.co

Received: February 10, 2022.

Accepted: July 10, 2023.

Zapata-Narváez YA, Díaz-García A and Beltrán-Acosta CR. 2023. Alternatives for the gray mold (*Botrytis cinerea*) control in cape gooseberry (*Physalis peruviana*) crop. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 372-390.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-5>

First DOI publication: July 31, 2023.

Primera publicación DOI: 31 de Julio, 2023.

Abstract. The effect of the field applications of three bioproducts (based on *Trichoderma koningiopsis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Bacillus amyloliquefaciens*), the alternation of the biostimulant Kendal® and the *Swinglea glutinosa* extract and the rotations of two fungicides (based on Azoxystrobin-Difenoconazole and Thiram-Pyrimethanol), on the incidence of gray mold in cape gooseberry postharvest was evaluated. For this purpose, the fruit was harvested weekly in the field, arranged in wet chambers with fruits with and without calyx, and incubated for seven

Resumen. Se determinó el efecto sobre la incidencia del moho gris en postcosecha de uchuva de las aplicaciones en campo de tres bioproductos a base de *Trichoderma koningiopsis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Bacillus amyloliquefaciens*, la alternancia del bioestimulante Kendal® y el extracto vegetal EcoSwing® y las rotaciones de fungicidas a base de Azoxistrobina - Difenoconazole y Thiram - Pyrimethanil. Semanalmente se cosechó la fruta, disponiendo en cámaras húmedas frutos con cáliz y sin este, incubadas durante siete días a 20 °C para promover el desarrollo de la enfermedad y determinar la eficacia en su control. Se realizó el seguimiento de las poblaciones de los antagonistas entre aplicaciones, mediante colecta de foliolos y el lavado en Tween 80 al 0.1%, sembrando alícuotas en medios específicos. En los frutos con cáliz la menor incidencia de la enfermedad con medias de 48 y 51% se presentó con las aplicaciones del hongo y la levadura respectivamente, mientras que en los frutos sin cáliz la incidencia no superó el 1.4% en todos los tratamientos. La población de antagonistas en la filósfera permaneció constante entre

days at 20 °C in laboratory conditions to promote the development of *B. cinerea* and determine the efficacy in its control. In addition, the populations of the microbial antagonists were monitored between applications by collecting the leaflets and washing them in 0.1% Tween 80 and sowing aliquots in specific culture media. In fruits with calyx, the lowest incidence of the gray mold, with averages of 48 and 51%, occurred with the applications of the bioproducts based on *T. koningiopsis* and *R. mucilaginosa*, respectively. In contrast, the incidence did not exceed 1.4% in fruits without calyx in all treatments. Furthermore, the population of microbial antagonists in the phyllosphere remained constant between applications, with counts of 1×10^3 CFU g⁻¹ for *T. koningiopsis* and 1×10^5 CFU g⁻¹ for *R. mucilaginosa* and *B. amyloliquefaciens*.

Keywords: Calyx, quiescent infections, incidence, efficacy.

The cape gooseberry (*Physalis peruviana*) crop in Colombia is important due to its economic impact, given the growing demand for this fruit in international markets (ICA, 2022). In the first seven months of 2022, fresh exports increased by 4.1% in comparison with the same period in 2021, with a FOB value of \$24.6 million, USD (ANALDEX, 2022), adding 5.29 t, equivalent to an increase of 10.4% in comparison with the same period in 2021 (ANALDEX, 2022). The total production in 2021 was 19.37 t in 1.44 ha, with an average yield of 11 t ha⁻¹, mainly in the departments of Cundinamarca (419 ha), Boyacá (404 ha), Nariño (204 ha) and Antioquia (146 ha), which represented 84% of the national production (AGRONET, 2022).

The crop also has a meaningful social impact due to the significant contribution towards food security, since in production costs, including

aplicaciones con recuentos de 1×10^3 UFC g⁻¹ para *T. koningiopsis* y de 1×10^5 UFC g⁻¹ para *R. mucilaginosa* y *B. amyloliquefaciens*.

Palabras clave: Cáliz, infecciones quiescentes, incidencia, eficacia.

En Colombia, el cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana*) es importante por su impacto económico dada la creciente demanda por esta fruta en los mercados internacionales (ICA, 2022). Durante los primeros siete meses del 2022, las exportaciones en fresco registraron un crecimiento del 4.1% frente al mismo periodo de 2021, con un valor FOB de USD 24.6 millones (ANALDEX, 2022), sumando 5.29 t equivalentes a un incremento del 10.4% con respecto al mismo periodo en 2021 (ANALDEX, 2022). La producción total en 2021 fue de 19.37 t en 1.44 ha, promediando un rendimiento de 11 t ha⁻¹, principalmente en los departamentos de Cundinamarca (419 ha), Boyacá (404 ha), Nariño (204 ha) y Antioquia (146 ha), que representaron el 84% de la producción nacional (AGRONET, 2022).

Adicionalmente, el cultivo tiene un impacto social importante, por el aporte significativo en seguridad alimentaria ya que, en los costos de producción, incluyendo cosecha y postcosecha, un 45% corresponde a mano de obra de mujeres, cabeza de familia. De otra parte, en la cadena productiva se demanda mano de obra adicional, ya que la uchuva que no se exporta (que puede representar un 40%), se transforma como fruta deshidratada, mermeladas, salsas, almíbares, entre otros subproductos que atienden el mercado nacional (ICA, 2022).

La uchuva es una baya carnosa y jugosa de color amarillo-naranja conocida por sus propiedades organolépticas (sabor, olor y color) y por su valor nutricional, al contener vitaminas A, B y C, Fe y P, fibra, carotenoides y flavonoides, conocidos por

harvest and postharvest, 45% corresponds to female workforce, heads of family. On the other hand, the productive chain demands additional workforce, since the cape gooseberry that is not exported (which can be 40%) is transformed into dried fruit, jams, sauces, syrups, and other subproducts that serve the national market (ICA, 2022).

The cape gooseberry is a fleshy and juicy yellow-orange berry known for its organoleptic properties (flavor, odor, and color) and its nutritional value since it contains vitamins A, B, and C, Fe and P, fiber, carotenoids, and flavonoids, known for their antioxidant properties (Puente *et al.*, 2011). The fruit is formed from solitary hermaphroditic flowers, with an accrescent calyx that, in the maturity of the fruit, reaches a length of 4 to 5 cm, known in Colombia as the *capacho*, which encloses and protects the fruit from several environmental conditions (pests, rain and cold) (Fischer and Lüdders, 1997; Nocetti *et al.*, 2020). Nevertheless, the calyx is susceptible to infection from several phytopathogens, such as *Cladosporium* sp., *Cercospora* sp., *Sclerotinia* sp., and *Botrytis cinerea*, the latter being the main limitation in production and postharvest (Forero, 2014). *B. cinerea* is the causal agent of gray mold, a cosmopolitan fungus that appears naturally in crops, affecting more than 250 plant species of agricultural interest. It is considered the second most limiting phytopathogen in agricultural production in the world, given its ability to environmental adaptation in the world, the costs related to its management, and the speed with which it can develop resistance to the fungicides used for their control (Dean *et al.*, 2012; Hahn, 2014; Carisse, 2016; Wenyong *et al.*, 2021).

Under field conditions, *B. cinerea* infects the calyx, causing disease if the environmental conditions are optimal (relative humidity $\geq 80\%$ and temperatures between 12 and 22 °C). However, if they are not favorable, the pathogen remains

sus propiedades antioxidantes (Puente *et al.*, 2011). El fruto se forma a partir de flores solitarias hermafroditas, con un cáliz acrescente que en la madurez de la fruta alcanza de 4 a 5 cm de largo, y que en Colombia es conocido como *capacho*, el cual encierra y protege al fruto de diversas condiciones medioambientales (plagas, lluvia, granizo y frío) (Fischer y Lüdders, 1997; Nocetti *et al.*, 2020). No obstante, el cáliz es susceptible a la infección de diversos fitopatógenos como *Cladosporium* sp., *Cercospora* sp., *Sclerotinia* sp. y *Botrytis cinerea*. Este último, es el principal limitante en la producción y postcosecha (Forero, 2014). *B. cinerea* es el agente causal del moho gris, hongo cosmopolita que se presenta de forma natural en los cultivos, afectando a más de 250 especies vegetales de interés agrícola, y es considerado como el segundo fitopatógeno más limitante en la producción agrícola en el mundo, dada su capacidad de adaptación ambiental, a los costos asociados a su manejo y a la rapidez con la que puede desarrollar resistencia a los fungicidas utilizados para su control (Dean *et al.*, 2012; Hahn, 2014; Carisse, 2016; Wenyong *et al.*, 2021).

En condiciones de campo, *B. cinerea* infecta el cáliz provocando la enfermedad si las condiciones ambientales son óptimas (humedad relativa $\geq 80\%$ y temperaturas entre 12 a 22 °C); sin embargo, si estas no son favorables, el patógeno permanece quiescente, reactivando la infección de forma agresiva cuando se tiene condiciones favorables, lo que coincide con la senescencia del cáliz y maduración de la fruta, particularmente durante el transporte en su exportación (que puede durar entre 15 y 20 días). La mayoría de los frutos, aunque pueden estar infectados, son asintomáticos al momento de su cosecha, pero la expresión de la enfermedad se evidencia cuando el fruto está en su destino, provocando pérdidas superiores al 15% (Molina *et al.*, 2004; Prusky y Lichter, 2007; Prusky *et al.*, 2013; Forero, 2014).

quiescent. It aggressively reactivates the infection when favorable conditions coincide with calyx's senescence and the fruit's maturation, particularly during the transportation in its export (which may last between 15 and 20 days). Most fruits may be infected yet are asymptomatic when harvested, but the expression of the disease is shown when the fruit arrives at its destination, causing losses of more than 15% (Molina *et al.*, 2004; Prusky and Lichter, 2007; Prusky *et al.*, 2013; Forero, 2014).

The gray mold is usually controlled with chemical fungicides. However, the resistance, food safety, harmful effects on the environment and human health, as well as the sustainability of the crop, increasingly limit the use of these chemical products, since in order for the fruits to be exported, mainly to Europe, compliance with the GLOBAL G.A.P standard is required, which restricts the residual concentration of different active ingredients of pesticides to minimum levels (Rincón *et al.*, 2015). The above produces the need to evaluate and select environmentally friendly management alternatives such as biopesticides, plant extracts, or biological inoculations, which are allowed and promoted in different production systems in the United States and the European Union since they generally pose little to no threat to the environment and humans (Bautista *et al.*, 2018). Their use in the cape gooseberry crop helps reduce the quiescent *B. cinerea* infections and reduces losses produced during the postharvest of the fruit. The aim of this work was to determine the efficacy of the application in the field of biopesticides based on *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Rhodotorula mucilaginosa* Lv316, a biological inoculant based on *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006, on a biostimulant (Kendal®) and an extract of *Swinglea glutinosa* (EcoSwing®) on the reduction of the quiescent *B. cinerea* infections, considering previous studies carried out on berry

El control del moho gris comúnmente se realiza mediante la aplicación de fungicidas químicos; sin embargo, la resistencia, inocuidad alimentaria, efectos nocivos sobre el ambiente y la salud humana, así como la sostenibilidad del cultivo limitan cada vez más el uso de estos productos químicos, ya que para su exportación particularmente a Europa, se debe cumplir con la norma GLOBAL G.A.P que restringe a niveles mínimos la concentración residual de diferentes principios activos de plaguicidas (Rincón *et al.*, 2015). Por lo anterior, surge la necesidad de evaluar y seleccionar alternativas de manejo amigables con el ambiente, como, bioplaguicidas, extractos vegetales o inoculantes biológicos, los cuales tienen un uso permitido y promovido en diferentes sistemas productivos en Estados Unidos y la Unión Europea, ya que generalmente representan poco o ningún riesgo al ambiente y humano (Bautista *et al.*, 2018) y cuyo uso en el cultivo de uchuva permita reducir las infecciones quiescentes de *B. cinerea* y disminuir las pérdidas producidas durante la postcosecha de la fruta. El objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de las aplicaciones en campo de bioplaguicidas a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Rhodotorula mucilaginosa* Lv316, un inoculante biológico a base de *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006, de un bioestimulante (Kendal®) y un extracto de *Swinglea glutinosa* (EcoSwing®) en la reducción de las infecciones quiescentes de *B. cinerea*, considerando estudios previos desarrollados en el cultivo de mora donde estos tratamientos mostraron eficacia de control del hongo de hasta el 60% (Zapata y Cotes, 2013, Hincapié *et al.*, 2017; Zapata y Beltrán, 2019).

MATERIALES Y MÉTODOS

Incidencia del moho gris en frutos. A partir de

crops, in which these treatments displayed and efficacy in the control of the fungus of up to 60% (Zapata and Cotes, 2013, Hincapié *et al.*, 2017; Zapata and Beltrán, 2019).

MATERIALS AND METHODS

Incidence of gray mold on fruits. From four commercial crops, one in the municipal area of Ubaté (locality La Patera), another in the municipal area of Sutatausa (locality Hato Viejo), and two in the municipal area of Granada (locality La Veintidós sector Alto and La Veintidós sector bajo), 100 asymptomatic cape gooseberry fruit samples were gathered, packed in paper bags, and transported in styrofoam coolers for their analysis in the AGROSAVIA Agricultural Microbiology Lab. The fruits were placed in wet chambers with a relative humidity of $\geq 90\%$ (HR) in sealed plastic containers measuring 14.5 x 24 x 36.5 cm (each one on a 1.70-ounce plastic cup) and stored in a room at 22 °C for seven days and next, the incidence of gray mold was measured according to the characteristic signs of the disease.

Evaluation of alternatives for management in the field. The experiment was established on the field with 220 cape gooseberry plants of the variety Corpoica-Dorada (Sánchez *et al.*, 2016) in the locality La Veintidós sector alto of the municipal area of Granada, department of Cundinamarca, Colombia (1.800 masl). During the seedling stage, the cape gooseberry plants were inoculated with *B. amyloliquefaciens* Bs006 (the active component of the bioproduct Natibac® SC) by spraying the substrate at the moment of planting, as well as 7 and 21 days after planting. On the field, the bacteria were applied as a drench at the moment of transplanting, as well as 7 and 15 days after this

cuatro cultivos comerciales, uno en el municipio de Ubaté (vereda La Patera), otro en el municipio de Sutatausa (vereda Hato viejo) y dos en el municipio de Granada (vereda La Veintidós sector Alto y La Veintidós sector bajo), se colectaron de cada uno, muestras de 100 frutos de uchuva asintomáticos, se empacaron en bolsas de papel y se transportaron en neveras de icopor para su análisis en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA. Los frutos se dispusieron en cámaras húmedas con una humedad relativa $\geq 90\%$ (HR) en recipientes plásticos sellados de 14.5 x 24 x 36.5 cm (cada uno sobre una copa plástica de 1.70 onzas) y se almacenaron en un cuarto a 22 °C durante siete días, a continuación, se registró la incidencia del moho gris de acuerdo con los signos característicos de la enfermedad.

Evaluación de alternativas de manejo en campo. Se estableció el experimento en campo con 220 plantas de uchuva de la variedad Corpoica-Dorada (Sánchez *et al.*, 2016) en la vereda La Veintidós sector alto del municipio de Granada, departamento de Cundinamarca, Colombia (1.800 msnm). Durante la etapa de semillero, las plántulas de uchuva fueron inoculadas con *B. amyloliquefaciens* Bs006 (principio activo del bioproducto Natibac® SC), mediante la aspersión al sustrato al momento de la siembra, a los 7 y 21 días después de la siembra. En campo, la bacteria se aplicó en drench al momento del trasplante, 7 y 15 días después de este a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹, como estrategia para promover el crecimiento de las plantas y aumentar su tolerancia al estrés biótico y abiótico (Beltrán-Acosta *et al.*, 2023). La fertilización química se realizó siguiendo un esquema establecido de acuerdo con el análisis químico del suelo. Los análisis postcosecha de la fruta se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA.

process, at a concentration of 1×10^8 UFC mL⁻¹, as a strategy to promote plant growth and increase their tolerance to biotic and abiotic stress (Beltrán-Acosta *et al.*, 2023). Chemical fertilization was carried out following a scheme established according to a chemical soil analysis. The postharvest analyses of the fruits were carried out in the Agricultural Microbiology Lab of the AGROSAVIA Tibaitatá Research Center.

When the cape gooseberry fruits began to form (approximately six months after planting), foliar applications of *T. koningiopsis* Th003 (Tricotec® WG), of the yeast *R. mucilaginosa* Lv316 (Nalev® WG) and *B. amyloliquefaciens* Bs006 (Natibac® SC) were carried out, as well as a treatment called Eco, consisting of three applications of a biostimulant containing oligosaccharides and glutathione (Kendal®) and three applications of *S. glutinosa* (EcoSwing®) extract was applied, as well as a chemical treatment that consisted of alternate applications, three of a fungicide based on Azoxystrobin - Difenoconazole and three of a fungicide based on Thiram - pyrimethanil (Table 1).

The experiment was established under a randomized complete block design with three repetitions, where the experimental unit (EU) consisted of two rows with five plants each (10 plants per EU) and 30 plants per treatment. A row of untreated plants separated each treatment. As a control, fruits were taken from a crop planted

Cuando se inició la formación de frutos de uchuva (aproximadamente 6 meses después de la siembra), se realizaron aplicaciones foliares de *T. koningiopsis* Th003 (Tricotec® WG), de la levadura *R. mucilaginosa* Lv316 (Nalev® WG) y *B. amyloliquefaciens* Bs006 (Natibac® SC); de un tratamiento denominado Eco correspondiente a tres aplicaciones de un bioestimulante que contiene oligosacarinas y glutatión (Kendal®) y tres del extracto de *S. glutinosa* (EcoSwing®) y de un tratamiento químico que correspondió a tres aplicaciones de un fungicida a base de Azoxistrobina - Difenoconazole y tres de un fungicida a base de Thiram - Pyrimethanil (Cuadro 1).

El experimento se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, donde la unidad experimental (UE) consistió en dos surcos de 5 plantas cada uno (10 plantas por UE) y un total de 30 plantas por tratamiento. Cada tratamiento se separó por un surco de plantas sin tratar. Como testigo se tomaron frutos de un cultivo sembrado simultáneamente en el mismo predio, pero en un área diferente, con la misma variedad y esquema de fertilización, pero sin aplicaciones de fungicidas para el control de enfermedades foliares. La variable evaluada fue la incidencia del moho gris.

Las aplicaciones se hicieron en la mañana mediante aspersión con bomba de espalda, realizando cinco aplicaciones con una frecuencia de 15 días. Después de la tercera aplicación, semanalmente se

Table 1. Treatments evaluated for the control of gray mold (*Botrytis cinerea*) in the cape gooseberry crop. Cuadro 1. Tratamientos evaluados para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de uchuva.

| Tratamiento | Dosis y concentración de aplicación |
|--|---|
| <i>T. koningiopsis</i> Th003 (Tricotec® WG) | 1 g L ⁻¹ / 1×10^6 conidios mL ⁻¹ |
| <i>R. mucilaginosa</i> Lv316 (Nalev® WG) | 2 g L ⁻¹ / 1×10^7 células mL ⁻¹ |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> Bs006 (Natibac® SC) | 50 mL L ⁻¹ / 1×10^8 UFC mL ⁻¹ |
| Eco (Kendal® / EcoSwing®) | 1 mL L ⁻¹ / 1.5 mL L ⁻¹ |
| Químico (Azoxistrobina - Difenoconazole / Thiram - Pyrimethanil) | 1.5 mL L ⁻¹ / 2 mL L ⁻¹ |

simultaneously in the same plot, but in a different area, with the same variety and fertilization scheme, without using fungicides to control of foliar diseases. The variable evaluated was the incidence of gray mold.

The applications were carried out in the morning using a backpack sprayer with a total of five applications at a frequency of 15 days. After the third application, 30 ripe fruits were taken every week from each repetition per treatment; they were packed in paper bags and transported in styrofoam coolers for their analysis in the lab. Once there, 18 fruits with calyxes were taken from each repetition and placed in a wet chamber in the conditions described earlier for seven days. In addition, 15 fruits were taken from the plants, their calyxes were removed, and they were placed under the same conditions.

Follow-up of the populations of antagonists in the phyllosphere. After the first application of the treatments and before the following applications, ten leaves were taken randomly from each repetition (30 leaves per treatment). The leaves were stored in paper bags, labeled, and transported in a styrofoam cooler for their analysis in the lab. Once there, the leaves from each repetition were cut into pieces measuring 1 cm in diameter using a sterile stainless steel hole puncher, 10 g were taken from the plant material and placed in an Erlenmeyer with 90 mL of Tween 80 at 0.1% (mother suspension) leaving them to be stirred constantly at 150 rpm for one hour. Next, a 1 in 10 dilution was performed for each one, they were homogenized in a vortex stirrer, and 100 μ L were taken and placed in Petri dishes (three replicas per dilution) containing Rose Bengal Agar for *T. koningiopsis* Th003, malt extract agar for *R. mucilaginosa* Lv316 and Luria Bertani agar for *B. amyloliquefaciens* Bs006, respectively. The aliquot was homogeneously distributed with a stainless steel

tomaron 30 frutos maduros de cada repetición por tratamiento, se empacaron en bolsas de papel y fueron transportados en neveras de icopor para su análisis en el laboratorio. En este, de cada repetición se tomaron 18 frutos con cáliz ubicándolos en una cámara húmeda en las condiciones anteriormente mencionadas durante siete días, adicionalmente se tomaron 15 frutos a los que se les retiró el cáliz y se dispusieron en iguales condiciones.

Seguimiento de las poblaciones de antagonistas en la filosfera. Después de la primera aplicación de los tratamientos y previo a las siguientes aplicaciones se tomaron de forma aleatorizada 10 hojas por repetición (30 hojas por tratamiento). Las hojas se guardaron en bolsas de papel, se etiquetaron y transportaron en nevera de icopor para su análisis en el laboratorio. En este, las hojas de cada repetición se cortaron en trozos de 1 cm de diámetro utilizando un sacabocado de acero inoxidable estéril, se tomaron 10 g del material vegetal y se dispusieron en un Erlenmeyer con 90 mL de Tween 80 al 0.1% (suspensión madre) dejándolos en agitación constante a 150 rpm durante una hora. A continuación, de cada uno se realizó una dilución 1 en 10, se homogeneizaron en un agitador vórtex y se tomaron 100 μ L disponiéndolos en cajas Petri (tres replicas por dilución), que contenían agar rosa de bengala para *T. koningiopsis* Th003, agar extracto de malta para *R. mucilaginosa* Lv316 y agar Luria Bertani para *B. amyloliquefaciens* Bs006, respectivamente. La alícuota se distribuyó homogéneamente con un rastrillo Drigalsky de acero inoxidable. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 horas para la bacteria y a 25 °C para la levadura y el hongo durante 48 horas y 5 días respectivamente; pasado este tiempo se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) y los resultados fueron reportados como UFC/g de foliolo [expresado como Log (UFC/g)].

Drigalsky spatula. The dishes were incubated at 28 °C for 48 for the bacteria and 25 °C for the yeast and fungus for 48 hours and 5 days, respectively. After this time, the culture forming units (CFUs) were counted, and the result was reported as CFU/g of leaflet [expressed as Log (UFC/g)].

Data analysis. For every treatment, the healthy fruits were added up along with those that displayed signs and symptoms of gray mold, and the percentage of incidence was determined using the following formula: Percentage of incidence = (Fruits with gray mold / Total fruits) *100. The data were analyzed with an analysis of variance and a means comparison using Fisher's LSD test (*= P>0.05) using the statistical software Statistix® 10.0. The efficacy in the control of the disease was estimated using Abbott's formula: Percentage of efficacy = ((Cd - Td) / Cd) *100. Where: Cd = Incidence in the control treatment and Td= Incidence per treatment (ANDI y ICA, 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

Incidence of the gray mold on fruits from quiescent *B. cinerea* infections in commercial crops. The calyx of the cape gooseberry encloses and protects the fruit from the environment (Fischer and Lüdders, 1997; Nocetti *et al.*, 2020). However, this exposure makes it susceptible to quiescent *B. cinerea* infections, and its senescence during the maturation of the fruit and a favorable environment during postharvest activate these infections and develop the disease (Figure 1). This condition was observed in this study, where the incidence of the gray mold from the quiescent *B. cinerea* infections in the fruits gathered surpassed 88% and even reached 100% in the crop of the locality La Veintidós sector bajo (Figures 2 and 3), showing

Análisis de datos. Por tratamiento se totalizaron los frutos sanos y que presentaban signos y síntomas del moho gris, y se determinó el porcentaje de incidencia utilizando la siguiente fórmula: Porcentaje de incidencia = (Frutos con moho gris / Frutos totales) *100. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba LSD de Fisher (*= P>0.05) empleando el software estadístico Statistix® 10.0. La eficacia en el control de la enfermedad se calculó empleando la fórmula de Abbott: Porcentaje de eficacia= ((Cd - Td) / Cd) *100. Donde: Cd = Incidencia en el tratamiento control y Td= Incidencia por tratamiento (ANDI y ICA, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia del moho gris en frutos a partir de infecciones quiescentes de *B. cinerea* en cultivos comerciales. El cáliz en la uchuva encierra y protege el fruto del ambiente (Fischer y Lüdders, 1997; Nocetti *et al.*, 2020), sin embargo, esta exposición lo hace susceptible a las infecciones quiescentes de *B. cinerea*, además su senescencia durante la maduración del fruto y un ambiente favorable durante la postcosecha, hacen que estas infecciones se activen y desarrollen la enfermedad (Figura 1). Esta condición se observó en este estudio, donde la incidencia del moho gris a partir de las infecciones quiescentes de *B. cinerea* en los frutos colectados superó el 88% alcanzando hasta el 100% en el cultivo de la vereda La Veintidós sector bajo (Figura 2 y 3), demostrando que el 80% de la fruta cosechada y con potencial destino de exportación puede estar infectada por *B. cinerea*.

Aunque para uchuva aún no se cuentan con estudios epidemiológicos que permitan establecer un modelo de infección para *B. cinerea*, se ha demostrado en otros sistemas productivos donde el



Figure 1. Top, healthy cape gooseberry (*Physalis peruviana*) fruits. Below, fruits with signs of gray mold (*Botrytis cinerea*) in the field, showing the presence of the mycelia and conidia of *Botrytis cinerea* with a grayish tone on the calyx and the berry inside.

Figura 1. Superior, frutos sanos de uchuva (*Physalis peruviana*). Inferior, frutos con signos de moho gris (*Botrytis cinerea*) en campo, observando la presencia del micelio y conidios de *Botrytis cinerea* con una tonalidad grisácea sobre el cáliz y la baya en su interior.

that 80% of the fruit harvested and with an export potential can be infected with *B. cinerea*.

Despite the lack of epidemiological studies that help establish an infection model for *B. cinerea* in cape gooseberry, the importance of quiescent infections has been proven in the losses the disease can cause in postharvest in other production systems in which the gray mold is one of the main limitations in their production. For example, investigations carried out on berries (*Rubus* sp.) have shown that this pathogen produces quiescent infections in all the physiological stages of the development of the fruit, leading to an incidence

moho gris es una de las principales limitantes en su producción, la importancia de las infecciones quiescentes en las pérdidas que la enfermedad puede provocar en la postcosecha. Por ejemplo, investigaciones desarrolladas en mora (*Rubus* sp.), han demostrado que este patógeno produce infecciones quiescentes en todos los estados fisiológicos de desarrollo de fruto, provocando en frutos maduros una incidencia del moho gris de entre el 60 y el 80% (Molina *et al.*, 2004); de la misma forma que Petrasch *et al.* (2019) y Rivera *et al.* (2013) lo han descrito en fresa (*Fragaria* sp.) y arándano (*Vaccinium corymbosum*), respectivamente.

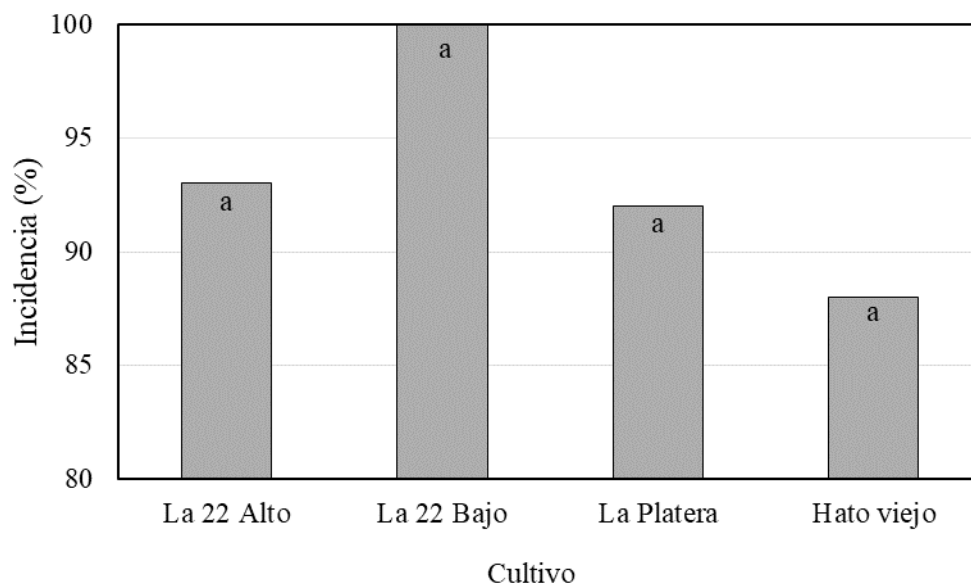


Figure 2. Incidence of gray mold (*Botrytis cinerea*) in cape gooseberry harvested in crops found in three municipal areas of Cundinamarca. Columns with the same letter are not significantly different, according to Fisher's LSD test ($*= P>0.05$).

Figura 2. Incidencia del moho gris (*Botrytis cinerea*) en frutos de uchuva cosechados en cultivos de tres municipios de Cundinamarca. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD ($*= P>0.05$).



Figure 3. Cape gooseberry fruits with signs of gray mold (*Botrytis cinerea*) after their storage in wet chambers.

Figura 3. Frutos de uchuva con signos de moho gris (*Botrytis cinerea*) después de su almacenamiento en cámaras húmedas.

of gray mold in mature fruits of 60 to 80% (Molina *et al.*, 2004), in the same way as Petrasch *et al.* (2019) and Rivera *et al.* (2013) have described for strawberries (*Fragaria sp.*) and cranberries (*Vaccinium corymbosum*), respectively.

Evaluación de alternativas de control en campo.

Para las dos primeras cosechas se observó la mayor incidencia del moho gris con valores de entre 60 y el 84% (Figura 4), este período de tiempo se caracterizó por precipitaciones con un promedio de 194 mm/día, que pudieron favorecer la incidencia

Evaluation of alternatives for control in the field.

The highest gray mold incidence was observed for the first two crops, with values between 60 and 84% (Figure 4). This period was characterized by precipitations with an average of 194 mm/day, which could favor the incidence of the disease. However, once this weather condition passed, and except for the control, which displayed a mean incidence of 83% throughout the evaluation period, the incidence in the treatments decreased, with the applications of Tricotec® WG and Nalev® WG standing out due to their mean incidences of 48 and 51%, respectively.

Nevertheless, the chemical treatment that displayed a mean incidence of 55% displayed the lowest incidence towards the end of the evaluation period, with 10% (Figure 4), coinciding with the applications of the Thiram – Pyrimethanil-

de la enfermedad; no obstante, pasada esta condición ambiental y a excepción del control que durante todo el período de evaluación presentó una incidencia media del 83%, la incidencia en los tratamientos disminuyó, destacando las aplicaciones de Tricotec® WG y Nalev® WG con una incidencia media del 48 y 51%, respectivamente.

No obstante, el tratamiento químico que presentó una incidencia media del 55% mostró hacia el final del periodo de evaluación la menor incidencia con un 10% (Figura 4), coincidiendo con las aplicaciones del fungicida a base de Thiram - Pyrimethanil, botricida que en Colombia no presenta un uso frecuente en uchuva (a diferencia de Azoxistrobina - Difenconazole), pero si en cultivos de rosa (*Rosa* sp.). Es probable que la baja exposición al fungicida, las poblaciones de *B. cinerea* en el cultivo de uchuva no presentaran resistencia; no

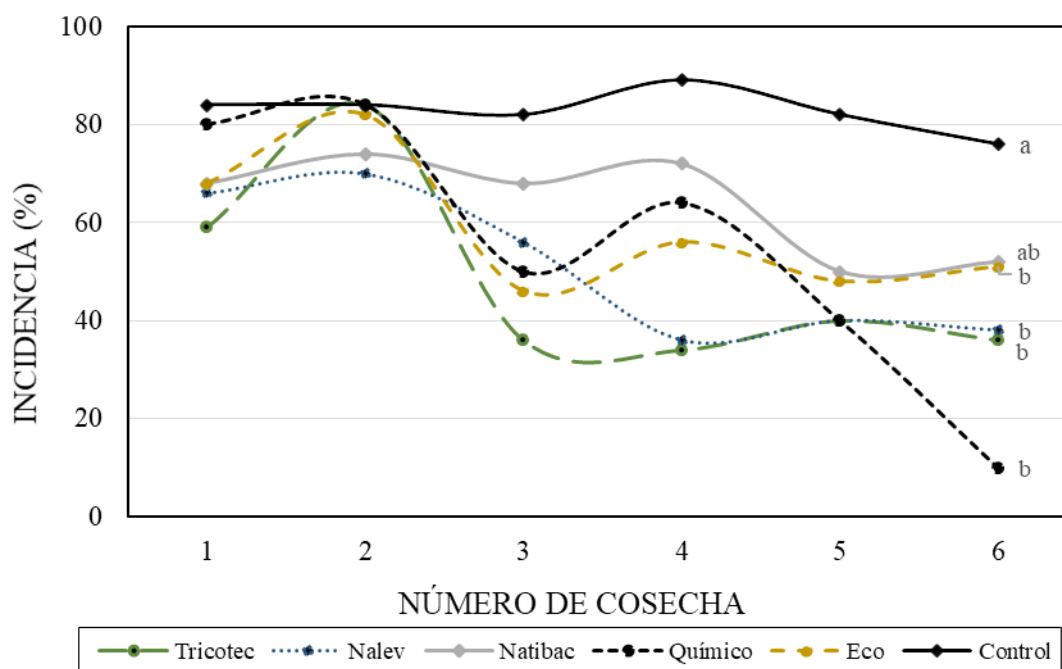


Figure 4. Weekly gray mold (*Botrytis cinerea*) incidence in the fruit harvested by treatment. Lines with the same line are not significantly different, according to Fisher’s LSD test (*= P>0.05).

Figura 4. Incidencia semanal del moho gris (*Botrytis cinerea*) en la fruta cosechada por tratamiento. Líneas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= P>0.05).

based fungicide, a botrycide that in Colombia is not frequently used in cape gooseberry (unlike Azoxystrobin - Difenconazole), although it is used in rose (*Rosa* sp.) crops. It is probable that due to the low exposure to the fungicide, the populations of *B. cinerea* in the cape gooseberry crop did not yet show resistance; however, in order to confirm this, studies are required to help determine the resistance of *B. cinerea* populations in crops in different locations to this and other fungicides.

The efficacy of the control of the gray mold was established, depending on the reduction of the incidence, noticing that all treatments presented some level of control; however, with the applications of *T. koningiopsis* Th003 and *R. mucilaginosa* Lv316, efficacies of 42 and 39% were obtained, respectively, making these the most prominent treatments (Figure 5).

Similar results in the control of *B. cinerea* have been reported for the berry crop, in which

obstante, para confirmarlo, es necesario desarrollar estudios que permitan determinar la resistencia de poblaciones de *B. cinerea* en cultivos de diferentes localidades a este y otros fungicidas.

De acuerdo con la reducción en la incidencia, se estableció la eficacia en el control del moho gris, observando que todos los tratamientos presentaron algún nivel de control; sin embargo, con las aplicaciones de *T. koningiopsis* Th003 y *R. mucilaginosa* Lv316 se obtuvieron eficacias del 42 y 39% respectivamente, siendo los tratamientos más destacados (Figura 5).

Resultados similares en el control de *B. cinerea* se han reportado en el cultivo de mora, donde al aplicar estos mismos bioplaguicidas y bajo un esquema similar de aplicación, se obtuvo una eficacia en el control del 60%, superior al obtenido con las aplicaciones de Procloraz (58%) o Carben-dazim (27%) (Zapata y Cotes, 2013). Con respecto al control de *B. cinerea* por *T. koningiopsis* y *R.*

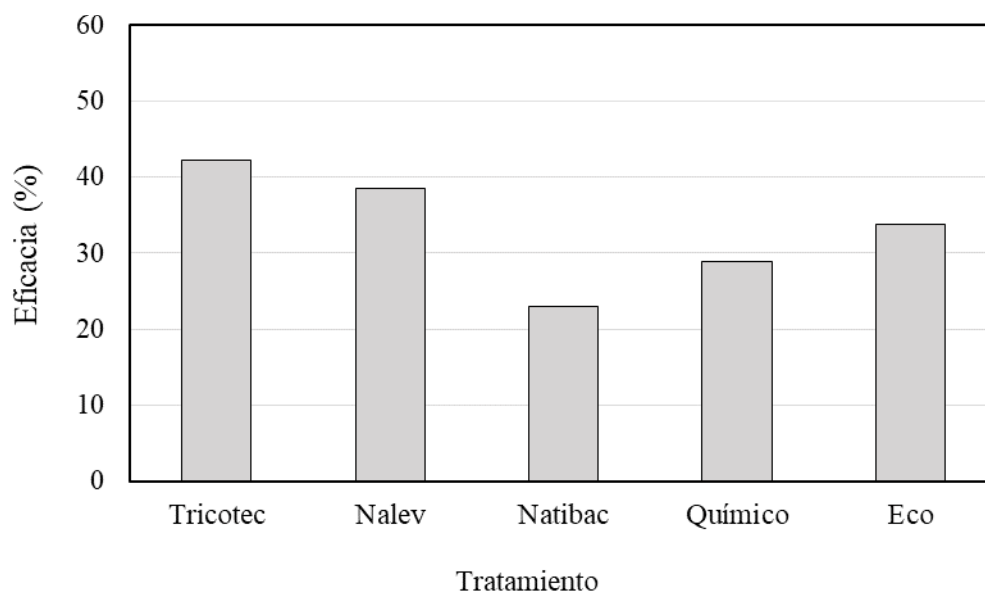


Figure 5. Efficacy of the treatments in the control of gray mold (*Botrytis cinerea*) in cape gooseberry fruits after 75 days of evaluation in the field.

Figura 5. Eficacia de los tratamientos en el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en frutos de uchuva después de 75 días de evaluación en campo.

the application of the same biopesticides under a similar application scheme gave a control efficacy of 60%, higher than that obtained with the applications of Prochloraz (58%) or Carbendazim (27%) (Zapata and Cotes, 2013). Regarding the control of *B. cinerea* with *T. koningiopsis* and *R. mucilaginosa*, it is necessary to consider that this pathogen is susceptible to the lack of nutrients since it limits the germination of conidia, the formation of the germinal tube and infections (Elad, 1996). Therefore, the application of these antagonists, with action modes such as the competition for space and nutrients, mycoparasitism, and antibiosis, was able to reduce the infection of the pathogen in the calyx (Freimoser *et al.*, 2019; Moreno-Velandia *et al.*, 2020).

On the other hand, the application of the Kendal[®] rotation and the extract of *S. glutinosa* with an efficiency of 34% (Figure 5) proves to be an alternative worth considering in the management of the disease. An example of this was the 65% reduction of the incidence of gray mold obtained with its applications alternated with Tricotec[®] WG in the berry crop (Zapata and Beltrán, 2019) or in the control of downy mildew in berries in rotation with biopesticides based on *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*, an extract of citrus seeds and copper-based fungicides (Boyzo-Marín *et al.*, 2015).

The oligosaccharins and glutathione found in Kendal[®] are considered biostimulating molecules that act as elicitors associated with the stimulation of defense response in plants (Guevara *et al.*, 2010; Garcia-Brugger *et al.*, 2006), whereas the *S. glutinosa* extract contains α -pinene and β -pinene, compounds with inhibiting action on the germination of conidia and mycelial growth (Camargo-Piñeres *et al.*, 2021). The combination of these mechanisms assists in the control of the pathogen in the plants treated.

mucilaginosa, es necesario considerar que este patógeno es susceptible a la ausencia de nutrientes, factor que limita la germinación de conidios, formación del tubo germinal e infección (Elad, 1996), por tanto, la aplicación de estos antagonistas, con modos de acción como competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis, pudieron reducir la infección del patógeno en el cáliz (Freimoser *et al.*, 2019; Moreno-Velandia *et al.*, 2020).

De otra parte, las aplicaciones de la rotación de Kendal[®] y el extracto de *S. glutinosa* con una eficacia del 34% (Figura 5) demuestra ser una alternativa a considerar en el manejo de la enfermedad, un ejemplo de esto fue la reducción del 65% en la incidencia del moho gris obtenida mediante sus aplicaciones alternadas con Tricotec[®] WG en el cultivo de mora (Zapata y Beltrán, 2019) o en el control del mildiu vellosa en mora en rotación con bioplaguicidas a base de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, un extracto de semillas de cítricos y fungicidas a base de cobre (Boyzo-Marín *et al.*, 2015).

Las oligosacarinas y glutatión presentes en Kendal[®] son considerados como moléculas bioestimulantes que actúan como elicitores asociados con la estimulación de respuestas de defensa en las plantas (Guevara *et al.*, 2010; Garcia-Brugger *et al.*, 2006), mientras que el extracto de *S. glutinosa* contiene α -pineno y β -pineno, compuestos que tienen acción inhibitoria sobre la germinación de los conidios y el crecimiento micelial (Camargo-Piñeres *et al.*, 2021). Esta combinación de estos mecanismos coadyuva para el control del patógeno en las plantas tratadas.

Por otro lado, con las aplicaciones de los fungicidas (tratamiento químico) se obtuvo una eficacia del 29% (Figura 5) y considerando que con las aplicaciones de Thiram - Pyrimethanil se observó menor incidencia al final del bioensayo, es necesario integrar en futuros estudios la rotación

On the other hand, the applications of the fungicides (chemical treatment) gave an efficacy of 29% (Figure 5), and considering that a lower incidence was observed at the end of the biotest with the applications of Thiram - Pyrimethanil, a rotation of products must be integrated into future studies in order to implement management strategies for the gray mold. It is convenient to evaluate the integration of the alternatives evaluated in this paper, applying them according to the weather conditions to obtain a better result and contribute to reducing the risk of fungicide-resistant *B. cinerea* populations.

In contrast, when removing the calyx from the fruit before storing, the incidence of gray mold did not surpass 2% (Figure 6), which leads us to assume that the quiescent *B. cinerea* infection is mainly produced in the calyx and from there, the pathogen is passed on to the fruit, or a microclimate

de productos, con el objetivo de implementar estrategias de manejo del moho gris. Es conveniente evaluar la integración de las alternativas evaluadas en este trabajo, aplicándolas de acuerdo con las condiciones ambientales para obtener de ellas un mejor resultado y contribuir a reducir el riesgo de poblaciones resistentes de *B. cinerea* a fungicidas.

Por otra parte, al retirar el cáliz del fruto previo a su almacenamiento, la incidencia del moho gris no superó el 2% (Figura 6), lo que permite suponer que las infecciones quiescentes de *B. cinerea* en su mayor proporción se producen en el cáliz y de este el patógeno pasa al fruto, o bien se genera un microclima favorable para el hongo; a diferencia de las infecciones en mora o fresa, donde las infecciones quiescentes se producen en estructuras florales como los estambres, carpelos o el receptáculo floral (Molina *et al.*, 2004; Petrasch *et al.*, 2019). De acuerdo con esto, se podría retirar el cáliz de la fruta

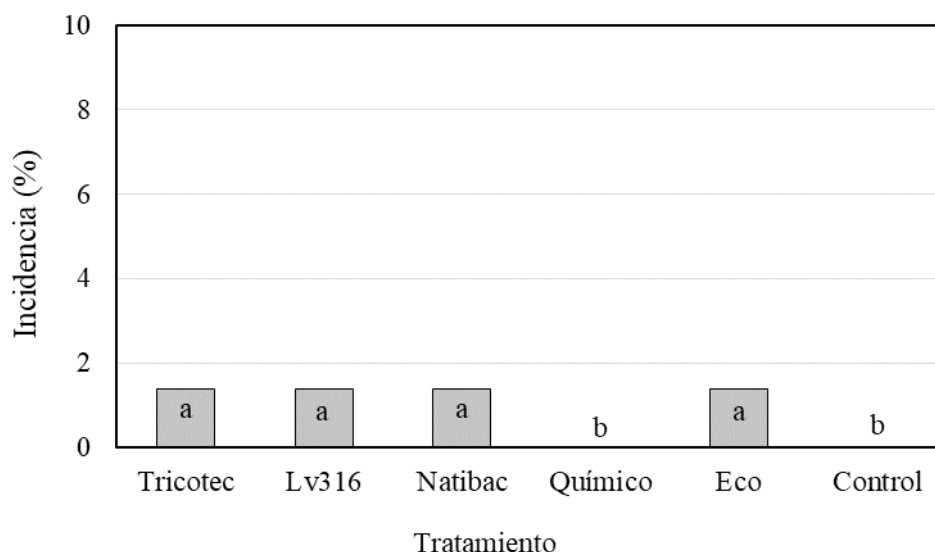


Figure 6. Accumulated incidence after 75 days of evaluation for gray mold (*Botrytis cinerea*) by treatment in cape gooseberry fruits without a calyx. Columns with the same letter are not significantly different, according to Fisher's LSD test (*= $P > 0.05$).

Figura 6. Incidencia acumulada después de 75 días de evaluación para el moho gris (*Botrytis cinerea*) por tratamiento en frutos de uchuva sin cáliz. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= $P > 0.05$).

is produced that is favorable for the fungus; unlike the infections in berries and strawberries, where the quiescent infections are produced in floral structures such as the stamen, carpel or the floral receptacle (Molina *et al.*, 2004; Petrasch *et al.*, 2019). According to this, the calyx could be removed from the fruit to reduce the risk of quiescent infections, although one of the market conditions, particularly in Europe, is the presence of the calyx on the fruit, making this alternative unviable.

Follow-up of the populations of antagonists in the phyllosphere. The phyllosphere is a hostile habitat for microorganisms: the low availability of nutrients, extreme temperatures, and solar radiation intensity make establishing antagonists difficult. Due to this, an inherent condition in an antagonist applied to the phyllosphere is its ability to adapt, colonize and remain in it since; otherwise, it will not carry out the control activity it was chosen to do (Andrews, 1992; Andrews and Harris, 2000). This study noticed that the antagonists colonized the cape gooseberry phyllosphere since their populations remained constant during the evaluation period, obtaining 1×10^3 UFC g^{-1} for *T. koningiopsis* Th003 per sampling, while *R. mucilaginosa* Lv316 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 were obtained 1×10^5 UFC g^{-1} (Figure 7).

Similar reports have been provided by authors such as Sylla and collaborators (2013), who applied biopesticides based on *Trichoderma harzianum* and *B. amyloliquefaciens* weekly for the control of *B. cinerea* in strawberries and obtained recounts of the phyllosphere of 1×10^2 UFC g^{-1} for the fungus and 2×10^4 UFC g^{-1} for the bacteria. Meanwhile, Elad and collaborators (1994) applied the yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus albidus* for the control of *B. cinerea* in tomato and recovered, from the phyllosphere, populations of 8×10^3 UFC cm^{-2} .

para reducir el riesgo de infecciones quiescentes; sin embargo, una de las condiciones del mercado y particularmente en Europa es la presencia del cáliz en fruto, por lo cual, no se considera viable dicha alternativa.

Seguimiento de las poblaciones de antagonistas en la filósfera. La filósfera es un hábitat hostil para los microorganismos, la baja disponibilidad de nutrientes, temperaturas extremas e intensidad de la radiación solar son condiciones que dificultan el establecimiento de los antagonistas, por esto una condición inherente en un antagonista aplicado a la filósfera es su capacidad para adaptarse, colonizarla y permanecer en ella, ya que de otra forma no efectuará la actividad de control por la que fue seleccionado (Andrews, 1992; Andrews y Harris, 2000). En este estudio se observó que los antagonistas colonizaron la filósfera de uchuva, ya que sus poblaciones permanecieron constantes durante el período de evaluación, obteniendo 1×10^3 UFC g^{-1} para *T. koningiopsis* Th003 por muestreo, mientras que para *R. mucilaginosa* Lv316 y *B. amyloliquefaciens* Bs006 se obtuvieron 1×10^5 UFC g^{-1} (Figura 7).

Resultados similares han sido reportados por autores como Sylla y colaboradores (2013), quienes al aplicar semanalmente bioplaguicidas a base de *Trichoderma harzianum* y *B. amyloliquefaciens* para el control de *B. cinerea* en fresa, obtuvieron recuentos de la filósfera de 1×10^2 UFC g^{-1} para el hongo y de 2×10^4 UFC g^{-1} para la bacteria; mientras que Elad y colaboradores (1994) al aplicar las levaduras *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus albidus* para el control de *B. cinerea* en jitomate recuperaron de la filósfera poblaciones de 8×10^3 UFC cm^{-2} .

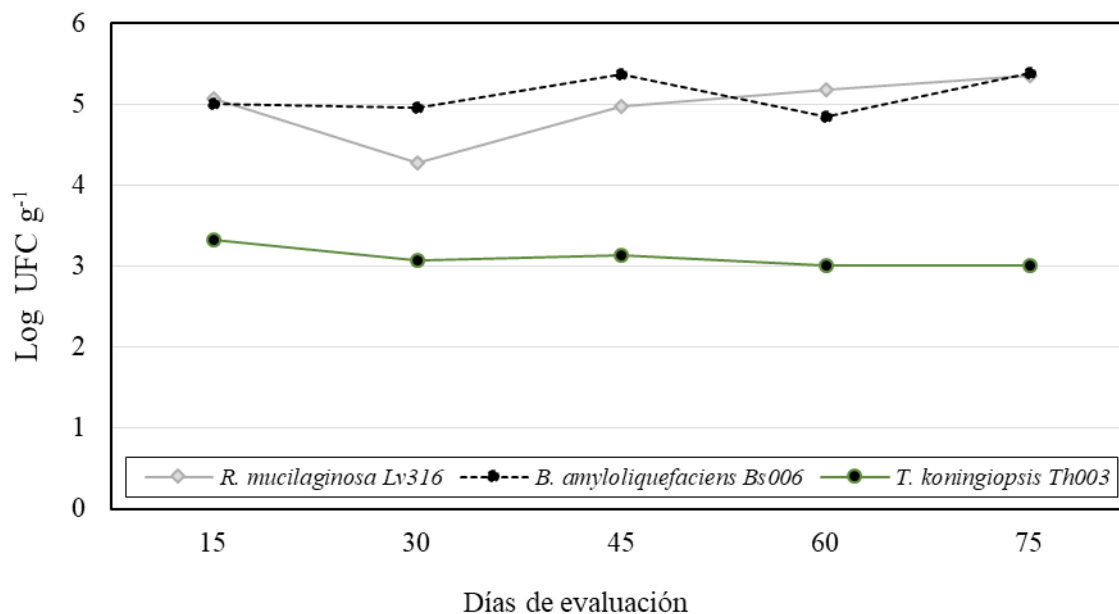


Figure 7. Follow-up of the population of antagonists applied on cape gooseberry plants during the evaluation period (October 7 to December 12, 2022).

Figura 7. Seguimiento de la población de antagonistas aplicados en plantas de uchuva durante el periodo de evaluación (del 7 de octubre al 21 de diciembre del 2022).

CONCLUSIONS

Applying biopesticides based on *T. koningiopsis* Th003 and *R. mucilaginosa* Lv316 on the field gave an efficacy in the reduction of quiescent *B. cinerea* infections of 42 and 39% respectively, in comparison with the 29% obtained with the alternated applications of Azoxistrobina - Difenconazole and Thiram – Pyrimethanil-based fungicides. These results pose the integration of biopesticides as viable and efficient in the integrated management strategies for the crop, thus contributing to reducing the number of fungicide applications in the field.

CONCLUSIONES

Con la aplicación en campo de bioplaguicidas a base *T. koningiopsis* Th003 y *R. mucilaginosa* Lv316, se obtuvo una eficacia en la reducción de las infecciones quiescentes de *B. cinerea* del 42 y 39% respectivamente, comparado con el 29% obtenido con las aplicaciones alternadas de los fungicidas a base de Azoxistrobina - Difenconazole y Thiram – Pyrimethanil. Estos resultados plantean como una opción viable y eficiente la integración de los bioplaguicidas en estrategias de manejo integrado del cultivo, contribuyendo así a reducir el número de aplicaciones de fungicidas en campo.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Colombia's General Royalties System (Sistema General de Regalías - SGR) and the Colombian Farming Research Corporation (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA) for the funds for the project “Development, transfer of technology and knowledge for the innovation to reduce the low competitiveness of cape gooseberry derived from the Covid-19 emergency by reducing vascular wilting in Ubaté and Granada, Cundinamarca” (Desarrollo, transferencia de tecnología y conocimiento para la innovación que reduzca la baja competitividad de uchuva derivada de la emergencia por el Covid-19, mediante la disminución del marchitamiento vascular en Ubaté y Granada, Cundinamarca) which helped develop this paper, as well as Blanca Lucia Botina Azain for her support in setting up the biotests in the lab.

LITERATURE CITED

- AGRONET. 2022. Reporte: Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo. Uchuva. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> (Consulta enero, 2023).
- Andrews JH. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603- 635. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.003131>
- Andrews JH and Harris RF. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38: 145-180. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.145>
- Asociación Nacional de Comercio Exterior - ANALDEX. 2022. Informe exportaciones de uchuva julio 2022. <https://www.analdex.org/2022/09/19/informe-exportaciones-de-uchuva-julio-2022/> (Consulta enero, 2023).
- Asociación Nacional de Empresarios de Colombia – ANDI and Instituto Colombiano Agropecuario – ICA. 2015. Manual para elaboración de protocolos para ensayos de eficacia con PQUA. ICA. 110 p. <https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/regulacion-y-control-de-plaguicidas-quimicos/manual-protocolos-ensayos-eficacia-pqua-1.aspx>
- Bautista EJ, Mesa L and Gómez MI. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria* 9(4): 585-604. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.15>

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sistema General de Regalías (SGR) de Colombia y a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA por la financiación del proyecto “Desarrollo, transferencia de tecnología y conocimiento para la innovación que reduzca la baja competitividad de uchuva derivada de la emergencia por el Covid-19, mediante la disminución del marchitamiento vascular en Ubaté y Granada, Cundinamarca.” que permitió el desarrollo de este trabajo y a Blanca Lucia Botina Azain por su apoyo en el montaje de los bioensayos en laboratorio.

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

- Beltrán-Acosta CR, Zapata-Narváez YA, Millán-Montaño DA and Díaz-García A. 2023. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas migulae* on the growth of gooseberry (*Physalis peruviana* L.) seedlings: Rizobacterias promotoras en plántulas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Mesoamericana* 34(1): 50669. <https://doi.org/10.15517/am.v34i1.50669>
- Boyzo-Marín J, Silva-Rojas H and Rebollar-Alviter A. 2015. Biorational treatments to manage dry berry of blackberry caused by *Peronospora sparsa*. *Crop Protection* 76: 121 – 126. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.03.023>
- Carisse O. 2016. Epidemiology and Aerobiology of *Botrytis* spp. In: Fillinger S and Elad Y. (Ed.). *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* Springer International Publishing p 127-148. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_7)
- Camargo-Piñeres Y, Zambrano-Montenegro G, Ortega-Cuadros M, Gutierrez-Montero D and Yepes-Escorcía J. 2021. Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Swinglea glutinosa* Merr sobre *Colletotrichum* sp., patógeno de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Colombiana De Biotecnología* 23(1):62-71. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.88025>
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13(4): 414-30. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

- Elad Y, Köhl J and Fokkema NJ. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology* 84(10): 1193-1200. <https://doi.org/10.1007/BF01876443>
- Elad Y. 1996. Mechanisms involved in biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102(8):719-732. <https://doi.org/10.1007/BF01877146>
- Fischer G and Lüdders P. 1997. Developmental changes of carbohydrates in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruits in relation to the calyx and the leaves. *Agronomía Colombiana* 14(2): 95-107. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21475>
- Forero MC. 2014. Enfermedades de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). In: Carvalho, C.P. and D.A. Moreno (eds.). *Physalis peruviana: fruta andina para el mundo*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo – CYTED, Limencop SL, Alicante, Spain. <https://www.vidarium.org/wp-content/uploads/2021/07/Uchiva-Physalis-peruviana-L-Fruta-andina-para-el-mundo.pdf>
- Freimoser FM, Rueda-Mejía MP, Tilocca B and Migheli Q. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 10(154): 2-19. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- García-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D and Pugin A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19(7): 711-724. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-0711>
- Guevara E, Hernández E, Arispuro I and Téllez M. 2010. Oligosacarininas derivadas de pared celular: Actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2): 144-155. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000200007&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000200007&lng=es)
- Hahn M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal Chemical Biological* 7(4):133-141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hincapié O, Saldarriaga A and Díaz C. 2017. Biological, botanical and chemical alternatives for the control of blackberry (*Rubus glaucus*, Benth.) diseases. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 70(2): 8169-8176. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/65987>
- Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. 2022. Colombia es el mayor productor y exportador de uchuva a nivel mundial. <https://www.ica.gov.co/noticias/ica-colombia-mayor-productor-exportador-uchuva> (Consulta enero, 2023).
- Molina S, De La Rotta M and Torres E. 2004. Incidencia de infecciones quiescentes de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth.). *Agronomía Colombiana* 22(2): 101-109. <https://www.redalyc.org/pdf/1803/180318264002.pdf>
- Moreno-Velandia CA, Izquierdo-García LF, Zapata-Narváez YA, Beltrán-Acosta CR and Zuluaga-Mogollón MV. 2020. Tricotec® WG Biofungicida. Recomendaciones de uso y patógenos blanco. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA. 48 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/36526>
- Nocetti D, Núñez H, Puente L, Espinosa A and Romero F. 2020. Composition and biological effects of goldenberry byproducts: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(12): 4335-4346. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10386>
- Petrasch S, Knapp SJ, van Kan J and Barbara BU. 2019. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 20(6): 877-892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- Prusky D and Lichter A. 2007. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters* 268(1): 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00603.x>
- 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>
- Puente LA, Pinto-Muñoz SA Castro ES and Cortés M. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Res. Int.* 44: 1733-1740. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034>
- Rincón NS, Figueredo CA and Salazar N. 2015. Impact of the application of the GLOBAL GAP norm, in the Latin American Agro-food sector. *Revista Colombiana De Investigaciones Agroindustriales* 2(1): 83-98. <https://doi.org/10.23850/24220582.173>
- Rivera S, Zoffoli JP and Latorre BA. 2013. Infection risk and critical period for the postharvest control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on blueberry in Chile. *Plant Disease* 97(8):1069-1074. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1112-RE>
- Sánchez E, Mayorga F, Navas A, Gómez L and Núñez V. 2016. Corpoica Dorada: variedad de uchuva para Boyacá, Cundinamarca y Antioquia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA. 12 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/11565>
- Sylla J, Alsanius BW, Krüger E, Reineke A, Strohmeier S, Wohanka W. 2013. Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology* 103(10): 1001-1011. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0014-R>
- Wenyong S, Youfu Z and Zhonghua M. 2021. Advances in Understanding Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* in China. *Phytopathology* 111(3): 455-463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA>

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. In: Zapata, J. (Ed.). Desarrollo de prototipos de bioplaguicida a base de *Rhodotorula glutinis* LvCo7 para el control de *Botrytis cinerea* en cultivos de mora. Bogotá: Produmedios p.73-79. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13072>

Zapata Y and Beltrán C. 2019. Evaluation of proposed integrated diseases management strategies in blackberry cultivation according to its sustainability. Revista Brasileira de Fruticultura 41(5): e-499. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019499>

# Biofilm of epiphytic algae and fungi in forest plantations of pinabete (*Abies guatemalensis*) in Guatemala

## Biopelícula de algas epífitas y hongos en plantaciones forestales de pinabete (*Abies guatemalensis*) en Guatemala

**Andrés Villalobos\***, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala, 18 Avenida 11-95 Zona 15, Guatemala, C.P. 01015, Guatemala; **Ana Lucía Dubón**, <sup>1</sup>Laboratorio de Protección Vegetal, <sup>2</sup>Herbario UVAL. Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios, Universidad del Valle de Guatemala, 18 Avenida 11-95 Zona 15, Guatemala, C.P. 01015, Guatemala; <sup>2</sup>**María Renée Álvarez**; **Sergio Osorio**, Coordinación de Pinabete, Instituto Nacional de Bosques (INAB), 7 Avenida 12-90 Zona 13, Guatemala, C.P. 01013, Guatemala; <sup>1</sup>**Margarita Palmieri**.

\*Corresponding author: andres.villalobos2012@gmail.com

Received: January 31, 2022.

Accepted: July 11, 2023.

Villalobos A, Dubón AL, Álvarez MR, Osorio S and Palmieri M. 2023. Biofilm of epiphytic algae and fungi in forest plantations of pinabete (*Abies guatemalensis*) in Guatemala. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 391-411.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2301-2>

First DOI publication: August 03, 2023.

Primera publicación DOI: 03 de Agosto, 2023.

**Abstract.** In recent years, a new pest has been reported in Guatemalan fir (*Abies guatemalensis*) plantations, a biofilm of microorganisms known as “green algae”. The objective of this research was to identify the algae and fungi that make up the biofilm growing on Guatemalan fir leaves. Leaf samples were collected from three locations where the biofilm has been reported, and the algae and fungi present on the leaves were isolated. Microorganisms

**Resumen.** En los últimos años se ha reportado la incidencia de una nueva plaga en las plantaciones de pinabete (*Abies guatemalensis*), una biopelícula de microorganismos conocida como el “alga verde”. El objetivo de esta investigación fue identificar las algas y hongos que conforman la biopelícula que crece sobre las hojas del pinabete. Se recolectaron muestras de hojas en tres localidades con presencia de la biopelícula, y se aislaron las algas y hongos presentes en estas. Se realizó el cultivo *in vitro* de los microorganismos y se identificaron por medio de microscopía de luz, en el caso de los hongos, también se realizó una extracción de ADN y una amplificación de la región ITS. A partir de 120 hojas colectadas de 15 árboles se identificaron cuatro algas de los géneros *Desmococcus*, *Klebsormidium* y la clase Trebouxiophyceae, así como 11 hongos de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Ulocladium*. La biopelícula que afecta a las plantaciones del

were cultured *in vitro* and identified by light microscopy; in the case of fungi, DNA extraction and amplification of the ITS region were also performed. Four algae of the genera *Desmococcus*, *Klebsormidium* and the class Trebouxiophyceae, and 11 fungi of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* and *Ulocladium* were identified from 120 leaves of 15 trees. It was concluded that the biofilm affecting Guatemalan fir plantations in Guatemala is composed of several species of epiphytic algae and fungi, which may vary according to the locality. The factors affecting the richness of microorganisms in the biofilm and their symbiotic relationship still need to be addressed.

**Keywords:** *Desmococcus*, *Klebsormidium*, *in vitro* culture, *Fusarium*, *Trichoderma*, ITS

The Guatemalan fir (*Abies guatemalensis*) is an endangered species in Mesoamerica and is commonly utilized as a Christmas tree in Guatemala. Over a span of 45 years, the extraction of trees and branches from natural forests has resulted in a staggering 95% reduction in populations (CONAP, 2010). This species is listed in the IUCN Red List of Threatened Species and is categorized under Appendix I of CITES, thereby prohibiting international trade. To address the national demand for Christmas trees, Guatemalan fir plantations were established in the 1990s, which not only mitigated the impact on natural forests but also contributed to species conservation. The cultivation of Guatemalan fir has emerged as an effective conservation strategy rooted in sustainable utilization (Strandby *et al.*, 2006; Strandby *et al.*, 2008).

One of the primary challenges encountered in Guatemalan fir plantations revolves around pest

pinabete en Guatemala está compuesta por varias especies de algas epifitas, hongos, las cuales pueden variar de acuerdo con la localidad. Aún es necesario abordar los factores que afectan la riqueza de microorganismos de la biopelícula y su relación simbiótica.

**Palabras clave:** *Desmococcus*, *Klebsormidium*, cultivo *in vitro*, *Fusarium*, *Trichoderma*, ITS

El pinabete (*Abies guatemalensis*) es una especie amenazada de Mesoamérica, usada comúnmente en Guatemala como árbol de navidad. La extracción de árboles y ramillas de bosques naturales llevó a una reducción del 95% de las poblaciones en 45 años (CONAP, 2010). El pinabete se encuentra en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN y en el apéndice 1 de CITES, por lo que se prohíbe el comercio internacional. En los años 90 se establecieron plantaciones de pinabete para satisfacer la demanda de árboles navideños a nivel nacional, lo que redujo el impacto sobre los bosques naturales y contribuyó a la conservación de la especie. El cultivo de pinabete ha demostrado ser una estrategia de conservación efectiva basada en el aprovechamiento sostenible (Strandby *et al.*, 2006; Strandby *et al.*, 2008).

Uno de los principales retos de las plantaciones de pinabete es el control de plagas forestales como áfidos (*Mindarus* sp.), la fumagina (*Capnodium* sp.) causada por excreciones de áfidos y la pudrición de raíz por *Phytophthora*. En los últimos años, se ha reportado una nueva plaga que está afectando significativamente las plantaciones: el “alga verde” del pinabete (Strandby *et al.*, 2008; INAB, 2018). Esta se reconoce por una cobertura polvosa de color verde que se forma sobre el tronco, las hojas y puede llegar a cubrir ramas completas. La biopelícula reduce la incidencia de luz y aumenta la

management, including aphids (*Mindarus* sp.), sooty mold (*Capnodium* sp.) resulting from aphid excretions, and root rot caused by *Phytophthora*. Recently, a noteworthy pest has been observed, significantly impacting the plantations: the “green algae” of the Guatemalan fir (Strandby *et al.*, 2008; INAB, 2018). This phenomenon is characterized by a powdery green coverage that manifests on trunks, leaves, and can even envelop entire branches. The biofilm formed by the algae diminishes light penetration and facilitates organic matter accumulation, thereby posing a risk of branch mortality. Furthermore, it compromises the aesthetic quality of the trees and diminishes their market value, consequently jeopardizing the profitability of Guatemalan fir cultivation. While the name implies an association with green algae, limited research exists regarding the identification of the algae and its potential correlation with other microorganisms, such as fungi (INAB, 2018; INAB, 2019).

Terrestrial algae have the ability to thrive on inert surfaces such as rocks and buildings, as well as on the surfaces of living organisms, including plants and animals (Novakova and Neustupa, 2015). This ecological phenomenon is referred to as epibiosis, where one organism, known as the epibiont, resides on the surface of another organism, the basibiont, potentially impacting it in various ways (Wahl, 2009). Algae frequently form symbiotic associations with other microorganisms, such as bacteria and fungi, resulting in the formation of biofilms (Freystein and Reisser, 2010).

Previous studies by multiple authors have documented instances of algae and fungi biofilms colonizing the leaves of *Abies* and other conifers in Europe and North America (Sochting, 1997; Poggio, 2002; Novakova and Neustupa, 2015). Nevertheless, this particular phenomenon has not been previously documented in *A. guatemalensis*.

acumulación de materia orgánica, lo cual puede ocasionar la muerte de las ramas. También afecta la calidad estética de los árboles y reduce su valor en el mercado, poniendo en riesgo la rentabilidad del cultivo de pinabete. Como su nombre lo sugiere, este fenómeno es causado por un alga verde, sin embargo, no hay estudios que aborden la identificación del alga, así como su posible asociación con otros microorganismos como hongos (INAB, 2018; INAB, 2019).

Las algas terrestres pueden crecer sobre superficies inertes como rocas y edificaciones, así como en la superficie de organismos vivos como plantas o animales (Novakova y Neustupa, 2015). Este último fenómeno se conoce como epibiosis, en el cual un organismo (epibionte) habita sobre la superficie de otro (basibionte), el cual puede o no verse afectado (Wahl, 2009). Las algas comúnmente se asocian con otros microorganismos para formar biopelículas, tales como bacterias y hongos (Freystein y Reisser, 2010).

Varios autores han reportado casos de biopelículas de algas y hongos creciendo sobre hojas de *Abies* y otras coníferas en Europa y Norteamérica (Sochting, 1997; Poggio, 2002; Novakova y Neustupa, 2015). Sin embargo, este fenómeno no ha sido descrito previamente en *A. guatemalensis*, por lo que el objetivo de esta investigación fue la identificación de las algas y hongos que conforman la biopelícula que crece sobre las hojas del pinabete (*Abies guatemalensis*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de muestras.** Se visitaron tres plantaciones de pinabete en los departamentos de Chimaltenango (Finca Valle Alto), Guatemala (Finca Billebén) y San Marcos (Finca Buena Vista) durante un año, de marzo de 2019 a marzo de 2020. Estas

Consequently, the primary objective of this research endeavor was to identify the specific algae and fungi species that comprise the biofilm found on the leaves of the Guatemalan fir (*Abies guatemalensis*).

## MATERIALS AND METHODS

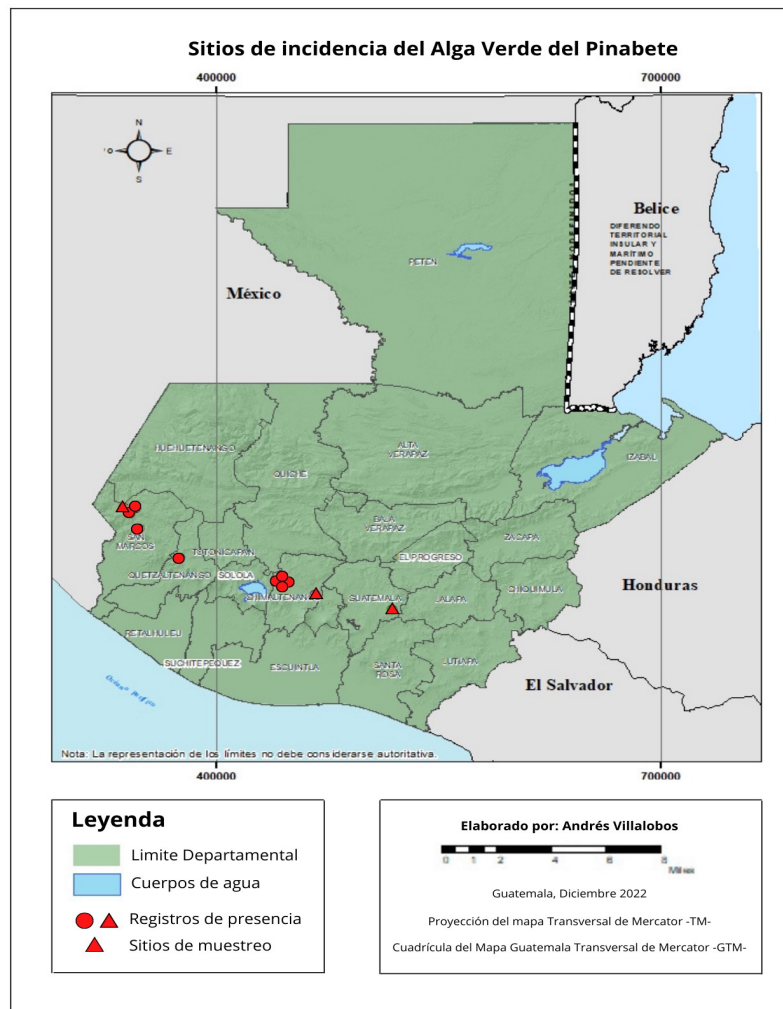
**Sample collection.** During a one-year period from March 2019 to March 2020, three Guatemalan fir plantations situated in the departments of Chimaltenango (Valle Alto Estate), Guatemala (Billebén Estate), and San Marcos (Buena Vista Estate) were visited. The selection of these plantations was based on records provided by the National Institute of Forests, which documented the presence of the biofilm in 10 plantations and one natural forest (Figure 1). In each plantation, a targeted sampling strategy was implemented, whereby five Guatemalan fir trees displaying signs of “green algae” infestation, with a height exceeding two meters and a diameter greater than 10 cm at a height of 1.5 m, were carefully chosen. The georeferencing of the selected trees was conducted, followed by the selection of four infested branches from each tree, with one branch being sampled at each cardinal point. Detailed photographic documentation of the branches was obtained, after which the branches were excised, placed in plastic bags, and stored in a cooler for transportation to the Plant Protection Laboratory at the Universidad del Valle de Guatemala. Subsequently, the branches were examined under a stereomicroscope, and the leaf coverings were gently scraped to facilitate microscopic analysis for the identification of algae and fungi.

**Algae identification.** Two leaves per branch were selected for analysis, resulting in a total of

plantaciones fueron seleccionadas con base a registros del Instituto Nacional de Bosques que indican la presencia de la biopelícula, la cual se ha reportado en 10 plantaciones y un bosque natural (Figura 1). En cada plantación se realizó un muestreo dirigido y se seleccionaron cinco árboles de pinabete que mostraran signos de infestación del “alga verde”, y que tuvieran una altura mayor a dos metros y un diámetro mayor a 10 cm a una altura de 1.5 m. Los árboles se georreferenciaron y en cada uno se seleccionaron cuatro ramas infestadas que estuvieran localizadas a la altura del previamente mencionada en los cuatro puntos cardinales. Se realizó un registro fotográfico de las ramas, se cortaron, se guardaron en bolsas plásticas y se almacenaron en una hielera para transportarlas al Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Estas se observaron bajo microscopio estereoscópico y se realizó un raspado de la cobertura de las hojas para su observación bajo microscopio de luz para la identificación de algas y hongos.

**Identificación de algas.** Se seleccionaron dos hojas de cada rama para el análisis, con un total de 8 hojas por árbol y 40 hojas por sitio de muestreo. Se realizó un raspado de la cobertura de cada hoja y se desinfectó durante 5 min con una solución de antibióticos (Gentamicina 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Estreptomycin 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y Carbendazim 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los raspados se filtraron al vacío y se sembraron en medio de cultivo sólido y líquido, tomando como referencia los métodos de Stanier *et al.* (1971), Andersen (2005) y Videv *et al.* (2017). Se utilizó el medio de cultivo de Kuhl y Lorenzen (1964) que está compuesto por 10mM KNO<sub>3</sub>, 4.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O, 0.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 1mM MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 0.1mM CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 0.025mM FeSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 1 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 1 $\mu$ M MnSO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O, 1 $\mu$ M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01 $\mu$ M (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O, 0.01 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O.





**Figure 1. Records of pinabete (*Abies guatemalensis*) plantations where the biofilm formed by algae and fungi was present.**  
**Figura 1. Registros de plantaciones de pinabete (*Abies guatemalensis*) con presencia de algas y hongos que conforman la biopelícula y sitios muestreados.**

eight leaves per tree and 40 leaves per sampling site. The leaf coverings were gently scraped, and each leaf was disinfested for 5 minutes using an antibiotic solution (Gentamicin 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Streptomycin 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and Carbendazim 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The scrapings were then vacuum-filtered and inoculated onto solid and liquid culture media following the methods outlined by Stanier *et al.* (1971), Andersen (2005), and Videv *et al.* (2017). Kuhl and Lorenzen's (1964) culture medium was

Los cultivos en medio líquido se mantuvieron con aireación constante y bombeo de  $\text{CO}_2$  a razón de 60 burbujas por min, con una temperatura de 28 °C y un fotoperiodo de 12 h con lámparas fluorescentes. Los cultivos se supervisaron diariamente para separar los que mostraran crecimiento de bacterias y hongos, los cuales se filtraron y se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) para la identificación de los microorganismos contaminantes. Después de una semana de crecimiento,

utilized, which consists of 10 mM KNO<sub>3</sub>, 4.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O, 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 1 mM MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 0.025 mM FeSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 1 μM ZnSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 1 μM MnSO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O, 1 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O, and 0.01 μM CuSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O.

The liquid cultures were maintained with constant aeration and CO<sub>2</sub> pumping at a rate of 60 bubbles per minute, at a temperature of 28 °C, and under a 12-hour photoperiod using fluorescent lamps. Daily monitoring of the cultures was conducted to identify instances of bacterial and fungal growth. Subsequently, the cultures were filtered and inoculated onto potato dextrose agar (PDA) medium to facilitate the identification of contaminating microorganisms. Following one week of growth, the algae were examined under a light microscope for genus-level identification. Taxonomic keys for terrestrial algae (Graham and Wilcox, 2009; Freystein and Reisser, 2010; John and Rindi, 2015; Archibald *et al.*, 2017), as well as the current classification based on the AlgaeBase and Index Nominum Algarum databases (AlgaeBase, 2023), were consulted as references.

**Identification of fungi.** The fungi were isolated from the collected leaves using an equivalent number of samples as in the algae identification process. Segments measuring 2 cm in length were carefully excised and subjected to disinfection with a 2% sodium hypochlorite solution and distilled water. Subsequently, the plant material was inoculated onto potato dextrose agar (PDA) culture medium. Four leaves from each branch were placed in individual Petri dishes and incubated at a temperature of 28 °C for a period of 5 days. Fungal growth that appeared on the leaves was cultivated, and the resulting cultures were purified using the hyphal tipping technique (Soto *et al.*, 2017).

se realizaron observaciones bajo microscopio de luz para identificar las algas a nivel de género. Se tomaron como referencia claves taxonómicas de algas terrestres (Graham y Wilcox, 2009; Freystein y Reisser, 2010; John y Rindi, 2015; Archibald *et al.*, 2017) y la clasificación actual de acuerdo con las bases de datos AlgaeBase e Index Nominum Algarum (AlgaeBase, 2023).

**Identificación de hongos.** Los hongos se aislaron a partir de las hojas recolectadas, se utilizó el mismo número de muestras que en la identificación de algas. Se cortaron segmentos de 2 cm de largo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% y agua destilada. El material vegetal se sembró en medio de cultivo PDA, se colocaron cuatro hojas de cada rama en una caja Petri y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Los hongos que crecieron sobre las hojas se cultivaron y se realizó la purificación de los cultivos por medio de la técnica de punta de hifa (Soto *et al.*, 2017). Después se hicieron montajes de las estructuras reproductivas y esporas en portaobjetos y se observaron bajo microscopio de luz para identificarlos a nivel de género. Se tomaron como referencia las claves taxonómicas de Farr *et al.* (1989) y Phillips y Burdekin (1992).

**Extracción de ADN y análisis molecular de hongos.** Cinco de los hongos aislados se identificaron a nivel de especie por medio de análisis genético. Se realizó la extracción de ADN con el protocolo de CTAB de Murray y Thompson (1980). Se añadió 300 mg de micelio a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le agregó 600 μL de buffer de extracción CTAB (2% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 100mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA y 0.2% 2-mercaptoetanol) precalentado a 65 °C. Se maceró el micelio con un macerador automático, se agregó 500 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 13,000

In order to achieve genus-level identification, reproductive structures and spores were mounted on microscope slides and examined under a light microscope. Taxonomic keys by Farr *et al.* (1989) and Phillips and Burdekin (1992) were utilized as references during the identification process.

**DNA extraction and molecular analysis of fungi.** Five fungi were identified at the species level through genetic analysis. DNA extraction followed the CTAB protocol by Murray and Thompson (1980). A 1.5 mL Eppendorf tube was loaded with 300 mg of mycelium, and 600  $\mu\text{L}$  of preheated CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, and 0.2% 2-mercaptoethanol) was added at 65 °C. The mycelium was homogenized using an automated homogenizer, followed by the addition of 500  $\mu\text{L}$  of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). After centrifugation at 13,000 rpm for 10 minutes, the supernatant was transferred to a new tube. Subsequently, 500  $\mu\text{L}$  of cold isopropanol and 50  $\mu\text{L}$  of 7.5 M ammonium acetate were added, and the sample was incubated at -20 °C for one hour. Further centrifugation at 13,000 rpm for 10 minutes resulted in the decantation of the supernatant, which was followed by the addition of 150  $\mu\text{L}$  of cold 70% ethanol. After centrifugation at 13,000 rpm for five minutes, the supernatant was decanted, and the precipitate was air-dried at 30 °C for 20 minutes. Finally, the precipitate was resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of preheated TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) at 65 °C and stored at 4 °C.

DNA was quantified, and the ITS region was analyzed using Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers: ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTG-CGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.*, 1990). The target PCR product size was

rpm por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Después se agregó 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y 50  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 7.5M y se incubó a -20 °C por una hora. Se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante, se añadió 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% frío y se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco min. Se decantó el sobrenadante y se secó el precipitado a 30 °C durante 20 min, finalmente se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) precalentado a 65 °C, y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Se cuantificó el ADN y se analizó la región ITS por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores: ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTG-CGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.*, 1990). El producto de PCR esperado fue de 650 pb. El volumen de la reacción fue de 25  $\mu\text{L}$ , el cual contenía 17.7  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X con  $\text{MgCl}_2$  a 25mM, 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTPs (10 mM), 1.3  $\mu\text{L}$  de cada cebador (10 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq-DNA polymerase 5U  $\mu\text{L}^{-1}$  (Invitrogen®). La reacción se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 15 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 90 s y extensión a 72 °C por 1 min; una extensión final de 60 °C por 30 min.

Los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se enviaron a la empresa Macrogen, Corea para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con las depositadas en la base de datos GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information) por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), posteriormente se depositaron para obtener su número de acceso (Zhang *et al.*, 2000). Las secuencias se depositaron en el SRA (Sequence Read

expected to be 650 bp. The reaction mixture had a volume of 25  $\mu\text{L}$ , comprising 17.7  $\mu\text{L}$  of sterile distilled water, 2.5  $\mu\text{L}$  of 10X buffer containing 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  of the dNTP mixture (10 mM), 1.3  $\mu\text{L}$  of each primer (10 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), and 0.2  $\mu\text{L}$  of Taq DNA polymerase (5U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (Invitrogen®). The amplification was performed in a thermocycler following this protocol: initial denaturation at 95 °C for 15 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 90 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension step at 60 °C for 30 min.

The amplified fragments were visualized using 1% agarose gel electrophoresis and sent to Macrogen, Korea for sequencing. The obtained sequences were analyzed and compared with those stored in the GenBank database of NCBI (National Center for Biotechnology Information) using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program. Subsequently, the sequences were deposited to acquire their respective accession numbers (Zhang *et al.*, 2000). These sequences have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the accession numbers SRR24660263, SRR24660264, SRR24660265, SRR24660266, and SRR24660267. These samples are associated with the BioProject accession number PRJNA974074.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Field observations.** Trunks and branches were discovered to be partially and fully infested with a biofilm (Figure 2). The presence of a green, powdery covering on trunks, branches, and leaves was used to identify the infestation, which originated at the base and extended upwards. In samples taken from Billebén Estate and Valle Alto Estate, branches exhibited a more pronounced biofilm with gray necrotic areas (Figure 2E), indicating an

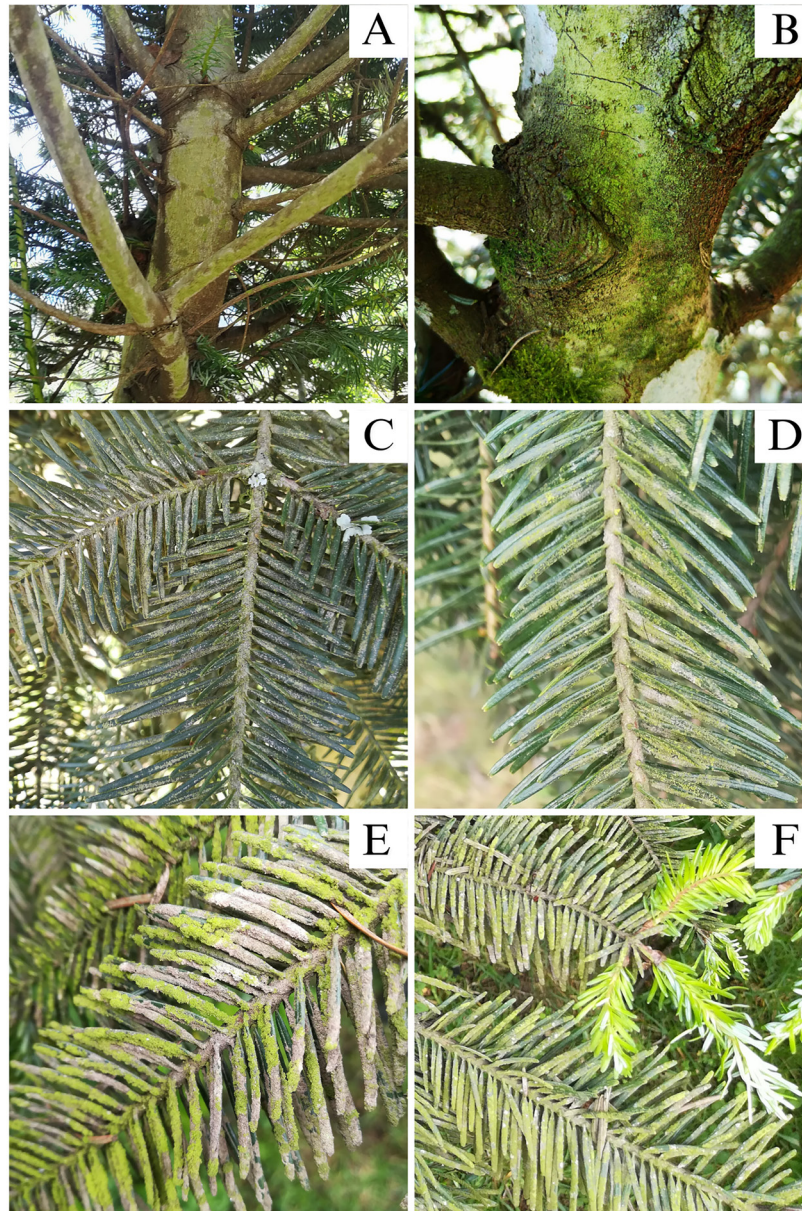
Archive) con los números de acceso SRR24660263, SRR24660264, SRR24660265, SRR24660266 y SRR24660267. Estas muestras forman parte del número de acceso de BioProject PRJNA974074.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Observaciones en campo.** Se encontraron troncos y ramas con infestación parcial y completa de la biopelícula (Figura 2). Esta se reconoció por la presencia de una cobertura verde polvosa en troncos, ramas y hojas, iniciando en la parte inferior y extendiéndose a la parte superior de las mismas. En las muestras de Finca Billebén y Finca Valle Alto se observaron ramas con una biopelícula más densa con secciones necróticas de color gris (Figura 2E), lo que indica una etapa avanzada de la infestación. Esto puede deberse a la infestación avanzada de hongos en la biopelícula, lo cual ya ha sido reportado previamente por Sochting (1997) en hojas de *Picea abies*. También se ha observado una mayor incidencia de hongos en hojas de coníferas conforme aumenta la edad de las ramas (Carroll *et al.*, 1977; Terhonen *et al.*, 2011).

Se encontró que, aún en las ramas completamente infestadas, los nuevos brotes de hojas no mostraron cobertura de la biopelícula (Figura 2F). Esta observación se realizó en octubre, y la producción de brotes inicia en mayo con la temporada de lluvias, lo que indica que los brotes pueden pasar hasta cinco meses libres de la biopelícula. Este fenómeno también ha sido reportado previamente en *Picea abies*, donde se encontró que las nuevas hojas empiezan a ser colonizadas por algas hasta seis meses después de haber brotado, y que las ramas más viejas tienen una cobertura más densa (Sochting, 1997).

Además de algas y hongos, también se encontraron musgos (Figura 3B), líquenes foliosos



**Figure 2.** Pinabete trees (*Abies guatemalensis*) infested with algal and fungal biofilm. A and B) Trunks covered by the biofilm. C and D) Branches with partial biofilm coverage. E) Branch with total biofilm coverage. F) Infested pinabete branch with leaf buds free of infestation.

**Figura 2.** Árboles de pinabete (*Abies guatemalensis*) infestados con la biopelícula de algas y hongos. A y B) Troncos cubiertos por la biopelícula. C y D) Ramas con cobertura parcial de la biopelícula. E) Rama con cobertura total de la biopelícula. F) Rama de pinabete infestada con brotes foliares libres de la infestación.

advanced stage of infestation. This occurrence can be attributed to the fungal infestation within the biofilm, as previously reported by Sochting (1997)

(Figura 3C), ácaros, diatomeas, polen y exoesqueletos de insectos en la biopelícula. Esta acumulación de detritos y materia orgánica en la biopelícula

in *Picea abies* leaves. Additionally, an increased occurrence of fungi on conifer leaves has been observed as the branches age (Carroll *et al.*, 1977; Terhonen *et al.*, 2011).

Even in branches completely infested, no biofilm coverage was observed on new leaf shoots (Figure 2F). This observation was made in October, while the onset of the rainy season is in May, when new shoots begin to emerge, suggesting that these shoots can remain biofilm-free for up to five months. Similar findings have been reported in *Picea abies*, where it was observed that new leaves become colonized by algae up to six months after bud formation, with older branches exhibiting a denser biofilm coverage (Sochting, 1997).

Traces of mosses (Figure 3B), foliose lichens (Figure 3C), mites, diatoms, pollen, and insect exoskeletons were also detected within the biofilm. This accumulation of debris and organic matter in the biofilm further hampers photosynthesis in the leaves and hastens senescence (Reuther, 1978; Sochting, 1997).

The field observations revealed that the biofilm of algae and fungi is not exclusively limited to Guatemalan fir. Leaf litter from other tree species exhibiting similar algae coverage was discovered in two plantations (Figure 4). This leaf litter was found in the canopy of affected Guatemalan fir trees, whereas the litter on the ground did not display any signs of the biofilm. This suggests that the biofilm adhered to the leaves due to their proximity to the source of inoculum.

The reasons why the Guatemalan fir is affected by the algae and fungi biofilm while other conifers in the same region, such as *Pinus maximinoi* or *P. oocarpa*, do not exhibit this phenomenon, are still unknown. According to Hoffman (1989), the growth of epiphytic algae is more influenced by physical factors such as temperature, light, and humidity than by the species of the host plant. However, other factors like bark pH and

reduce aún más la fotosíntesis en las hojas y acelera la senescencia (Reuther, 1978; Sochting, 1997).

Las observaciones en campo demostraron que la biopelícula de algas y hongos no crece únicamente sobre el pinabete. En dos plantaciones se encontró hojarasca de otras especies de árboles con la misma cobertura de algas (Figura 4). Esta hojarasca se encontró en la copa de los pinabetes afectados, mientras que la hojarasca en el suelo no mostraba presencia de la biopelícula, lo que indica que esta se adhirió a las hojas por su proximidad con la fuente del inóculo.

Aún se desconoce por qué el pinabete es afectado por la biopelícula de algas y hongos, pero en otras coníferas de la misma región no presentan dicho fenómeno, tales como *Pinus maximinoi* o *P. oocarpa*. De acuerdo con Hoffman (1989), el crecimiento de algas epífitas está más controlado por factores físicos (temperatura, iluminación, humedad) que por la especie de planta basibionte. Aun así, otros factores como el pH de la corteza y la especie del árbol influyen en la colonización de algas (Alwi *et al.*, 2015; Stifterova y Neustupa, 2015), por lo que los árboles de pinabete podrían presentar características que facilitan el crecimiento de estas.

**Identificación de algas.** En las 120 hojas de los 15 árboles analizados (5 árboles por sitio de muestreo) se encontraron cuatro especies de algas en las hojas de pinabete (Cuadro 1). El alga *Desmococcus* sp. se encontró en las tres localidades (Figura 5), dos especies diferentes del género *Klebsormidium* se encontraron en dos localidades (Finca Valle Alto y Finca Billeben) y un alga unicelular de la clase Trebouxiophyceae se encontró en una localidad (Finca Billeben), esta no fue identificada a nivel de género debido a la falta de características diagnósticas observables. No fue posible realizar análisis genético de las algas debido a la falta de cultivos puros, por lo que es necesario optimizar el método



**Figure 3.** Pinabete branches and leaves infested with the algal and fungal biofilm seen under stereoscope. A) Pinabete bark 20 X. B) Pinabete branch 20 X. C and D) Pinabete branches 10 X. E) Pinabete leaf covered by biofilm with necrotic section 20 X. F) Pinabete leaf underside 45 X.

**Figura 3.** Ramas y hojas de pinabete infestadas con la biopelícula de algas y hongos vistas bajo estereoscopio. A) Corteza de pinabete 20 X. B) Rama de pinabete 20 X. C y D) Ramas de pinabete 10 X. E) Hoja de pinabete cubierta por la biopelícula con una sección necrótica 20 X. F) Envés de hoja de pinabete 45 X.

tree species can also influence algae colonization (Alwi *et al.*, 2015; Stifterova and Neustupa, 2015), suggesting that Guatemalan fir trees may possess specific characteristics that facilitate the growth of these organisms.

de desinfección del material vegetal utilizando diferentes concentraciones de antifúngicos y tiempos de desinfección que puedan eliminar hongos y bacterias sin afectar el crecimiento las algas (Laezza *et al.*, 2022).

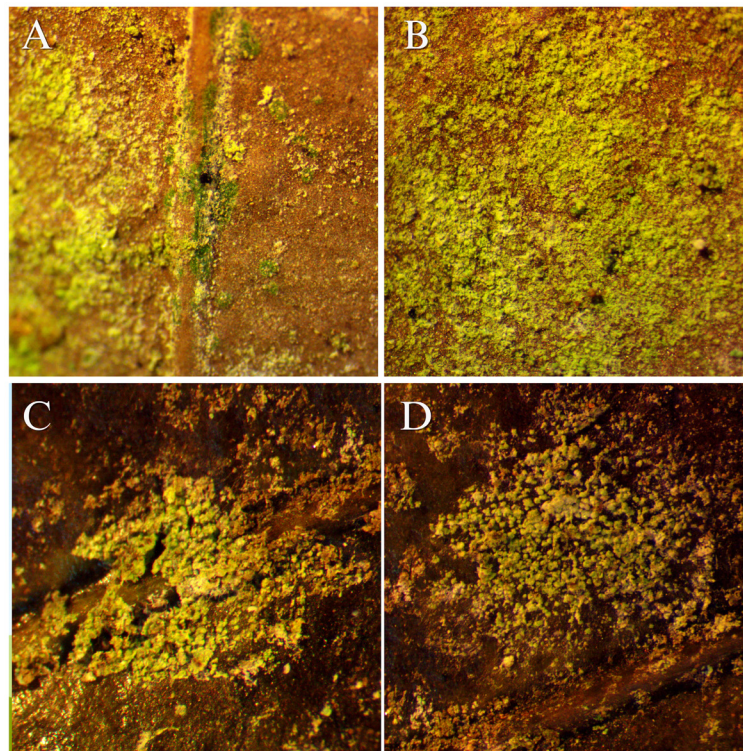


Figure 4. Angiosperm leaves found in the canopy of pinabetes infested with algae. A and B) Location: Finca Billeben, Guatemala 15 X. C and D) Location: Finca Valle Alto 15 X.  
Figura 4. Hojas de angiospermas encontradas en la copa de pinabetes infestados con algas. A y B) Localidad: Finca Billeben, Guatemala 15 X. C y D) Localidad: Finca Valle Alto 15 X.

**Algae identification.** In the 120 leaves of the 15 analyzed trees (5 trees per sampling site), four species of algae were found on the pinabete leaves (Table 1). The alga *Desmococcus* sp. was present in all three locations (Figure 5), two different species of the genus *Klebsormidium* were found in two locations (Finca Valle Alto and Finca Billeben), and a unicellular alga belonging to the class Trebouxiophyceae was found in one location (Finca Billeben). However, due to the lack of observable diagnostic characteristics, the genus of this alga could not be identified. Genetic analysis of the algae was infeasible due to the absence of pure cultures. Hence, there is a need to optimize the method of plant material disinfection by employing

Las algas identificadas en este estudio pertenecen a géneros que se han descrito como organismos formadores de biopelículas fotosintéticas en superficies naturales y artificiales como suelos, plantas, rocas y construcciones (Ljaljević-Grbić *et al.*, 2010; Rindi y Guiry, 2004; Stifterova y Neustupa, 2015). Ninguna de las algas identificadas ha sido reportada como parásitas o causantes de enfermedades en plantas, estas utilizan la corteza y las ramas como superficie para crecer, así como otros organismos epibiontes, entre ellos líquenes o musgos (Neustupa y Albrechtova 2003; Wahl, 2009).

Se encontró que la composición de especies de algas en la biopelícula puede variar de acuerdo con la localidad. Esta variación puede deberse



**Table 1. Comparison of algae and fungi groups found in pinabete plantations in Chimaltenango, Guatemala and San Marcos, Guatemala.****Cuadro 1. Comparación de grupos de algas y hongos encontrados en las plantaciones de pinabete en las localidades de Chimaltenango, Guatemala y San Marcos, Guatemala.**

| Clasificación                   | Localidades               |                                 |                              |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|
|                                 | Finca Billeben, Guatemala | Finca Valle Alto, Chimaltenango | Finca Buena Vista San Marcos |
| <b>Algas</b>                    |                           |                                 |                              |
| <i>Desmococcus</i> sp.          | X                         | X                               | X                            |
| <i>Klebsormidium</i> sp1.       | X                         |                                 |                              |
| <i>Klebsormidium</i> sp2.       |                           | X                               |                              |
| Trebouxiophyceae                | X                         |                                 |                              |
| <b>Hongos</b>                   |                           |                                 |                              |
| <i>Alternaria</i> sp.           | X                         |                                 |                              |
| <i>Aspergillus</i> sp.          | X                         |                                 |                              |
| <i>Fusarium equiseti</i>        |                           | X                               |                              |
| <i>F. graminearum</i>           |                           | X                               |                              |
| <i>Fusarium</i> sp.             |                           | X                               |                              |
| <i>Mucor hiemalis</i>           |                           |                                 | X                            |
| <i>Mucor</i> sp.                |                           | X                               |                              |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i> |                           |                                 | X                            |
| <i>Trichoderma viride</i>       |                           |                                 | X                            |
| <i>Trichoderma</i> sp.          | X                         |                                 |                              |
| <i>Ulocladium</i> sp.           | X                         |                                 |                              |

different concentrations of antifungal agents and disinfection durations that effectively eliminate fungi and bacteria while preserving algal growth (Laezza *et al.*, 2022).

The algae identified in this study belong to genera that have been documented as photosynthetic biofilm-forming organisms on both natural and artificial surfaces, including soil, plants, rocks, and structures (Ljaljević-Grbić *et al.*, 2010; Rindi and Guiry, 2004; Stifterova and Neustupa, 2015). None of the identified algae have been reported as parasites or pathogens of plants. Instead, they utilize the bark and branches as suitable substrates for growth, often coexisting with other epibiotic organisms such as lichens or mosses (Neustupa and Albrechtova, 2003; Wahl, 2009).

a la madurez y la edad de la cobertura sobre las hojas. Se ha demostrado que existe una sucesión en las biopelículas de microorganismos similar a la que sucede en los bosques, ya que la abundancia y riqueza de especies de algas varía de acuerdo con el tiempo (Neustupa y Albrechtova, 2003; Poggio, 2002). El alga *Desmococcus* sp. se encontró en todas las localidades, lo que sugiere que es un colonizador temprano en la biopelícula (Schnurr y Allen, 2015). Por otra parte, las algas filamentosas como *Klebsormidium* suelen ser colonizadores tardíos (Sochting, 1997). Esto implica que las localidades de Finca Billeben y Finca Valle Alto presentan árboles con una biopelícula más desarrollada y de mayor edad. En estas mismas localidades se encontraron ramas con parches necróticos con una infestación avanzada de hongos.

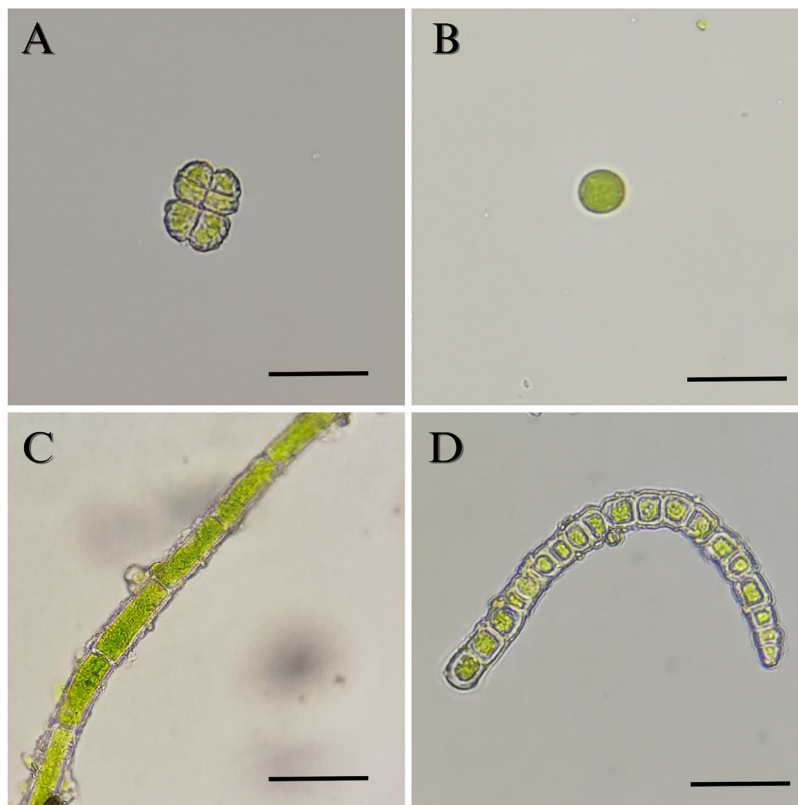


Figure 5. Algae isolated from pinabete leaves infested with algal and fungal biofilm. A) *Desmococcus* sp. 400 X. B) *Trebouxiophyceae* 400 X. C) *Klebsormidium* sp1. 400 X. D) *Klebsormidium* sp2. 400 X. Scale bar equals 10  $\mu$ m.

Figura 5. Algas aisladas a partir de hojas de pinabete infestados con biopelícula de algas y hongos. A) *Desmococcus* sp. 400 X. B) *Trebouxiophyceae* 400 X. C) *Klebsormidium* sp1. 400 X. D) *Klebsormidium* sp2. 400 X. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

The species composition of algae within the biofilm was found to vary across different locations, likely influenced by the maturity and age of leaf coverage. Similar to forest ecosystems, a succession of microorganism biofilms occurs, resulting in fluctuations in algae abundance and species richness over time (Neustupa and Albrechtova, 2003; Poggio, 2002). The alga *Desmococcus* sp. was consistently present in all locations, indicating its role as an early colonizer in the biofilm (Schnurr and Allen, 2015). In contrast, filamentous algae such as *Klebsormidium* tend to colonize the biofilm at later stages (Sochting, 1997). Consequently, the Finca Billebén and Finca Valle Alto locations

La variabilidad en la riqueza de especies también puede deberse a factores como el pH de la corteza, la humedad, iluminación y concentración de nitrógeno y fósforo (Novakova y Neustupa, 2015). La intensidad de manejo de un bosque también puede afectar las especies de una biopelícula, ya que los bosques que tienen una mayor frecuencia de raleos y podas presentan una menor cobertura de dosel y una mayor riqueza de especies de algas (Glaser *et al.*, 2018; Stifterova y Neustupa, 2015). Estos factores ambientales y antropogénicos deberán ser abordados en futuras investigaciones para conocer cómo afectan el desarrollo de la biopelícula en las hojas del pinabete.

harbor trees with more developed and mature biofilms. Additionally, these locations exhibited branches with necrotic patches, indicating an advanced fungal infestation.

The variability in species richness can also be attributed to factors such as bark pH, humidity, light exposure, and nitrogen and phosphorus concentration (Novakova and Neustupa, 2015). Forest management practices can also influence the species composition of the biofilm, as forests with higher frequencies of thinning and pruning exhibit reduced canopy coverage but higher species richness of algae (Glaser *et al.*, 2018; Stifterova and Neustupa, 2015). These environmental and anthropogenic factors should be further investigated in future research to elucidate their impact on the development of biofilm on pinabete leaves.

**Identification of fungi.** From the analysis of 120 leaves collected from 15 trees, a total of 11 fungal species were isolated from Pinabete leaves (Table 1), representing six genera (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, and *Ulocladium*). These genera comprise organisms with diverse ecological roles, including pathogens, saprophytes, and beneficial species. Through ITS region sequencing, five of the fungal species were identified at the species level (Table 2). When comparing the sequences of this study with those of the NCBI gene bank, homology ranged from 93.3 to 97.6 % (Table 2). This low homology may be due to other variants or species. Therefore, further morphological and molecular studies are considered pertinent.

Three species of *Trichoderma* (*Trichoderma* sp., *T. koningiopsis*, *T. viride*) were identified in Finca Billeben (Guatemala) and Finca Buena Vista (San Marcos). These species are known for their antagonistic effects against pathogens, particularly *Fusarium*, and have previously been isolated from *Abies* and other conifer leaves in Europe

**Identificación de hongos.** A partir de las 120 hojas de los 15 árboles analizados, se aislaron 11 especies de hongos que se encontraron en las hojas de pinabete (Cuadro 1), pertenecientes a seis géneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Ulocladium*). Estos géneros corresponden a organismos que se conocen como patógenos, saprófitos y benéficos. Cinco de los hongos se identificaron molecularmente a nivel especie por la amplificación de la región ITS (Cuadro 2). Al comparar las secuencias de este estudio con las del banco de genes del NCBI, se observó una homología que osciló entre 93.3 al 97.6 % (Cuadro 2). Esta baja homología puede deberse a que sean otras variantes o especies. Por lo que se considera pertinente realizar más estudios morfológicos y moleculares.

Se encontraron tres especies de *Trichoderma* (*Trichoderma* sp., *T. koningiopsis*, *T. viride*) en la Finca Billeben (Guatemala) y la Finca Buena Vista (San Marcos). Estas especies son antagónicas de patógenos como *Fusarium*, y han sido aisladas previamente a partir de hojas de *Abies* y otras coníferas de Europa (Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1994). Los hongos *Alternaria* sp. y *Ulocladium* sp. también se encontraron en la Finca Billeben (Guatemala), estos hongos pueden causar necrosis en hojas y se han reportado afectando especies arbóreas (Danelia *et al.*, 2021; Vannini and Vettrano, 2000).

En la finca Valle Alto se encontraron dos especies de *Fusarium*: *F. equiseti* y *F. graminearum*. Esta última causa la podredumbre del tallo en maíz y afecta principalmente a gramíneas, a pesar de esto, ha sido aislada a partir de numerosas familias de plantas. Las esporas del hongo se depositan y acumulan en hojas y se convierten en una fuente de inóculo para gramíneas (Miller *et al.*, 2007). En este caso, las esporas de este hongo posiblemente se transportaron desde plantaciones de maíz aledañas, ya que este cultivo suele asociarse con el pinabete en un modelo agroforestal (INAB, 2019).

**Table 2. Percentage of sequence similarity of ITS region sequences of fungi isolated and identified from pinabete leaves**  
**Cuadro 2. Porcentaje de similitud de secuencias de la región ITS de hongos aislados e identificados de hojas de pinabete.**

| ID                              | Especie                         | Cobertura (%) | Homología (%) | Referencia de BLAST                                                                                                                                                                                                                                           | Accesión   |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ITS seq of <i>Fusarium</i> b    | <i>Fusarium equiseti</i>        | 99.5          | 97.65         | <i>F. equiseti</i> isolate Anna6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence     | MN498032.1 |
| ITS seq of <i>Fusarium</i> R    | <i>F. graminearum</i>           | 99.65         | 96            | <i>F. graminearum</i> isolate PAK-14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence | MH054924.1 |
| ITS seq of <i>Mucor</i> h       | <i>Mucor hiemalis</i>           | 99.31         | 93.55         | <i>M. hiemalis</i> isolate SL71_64a_Y2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence                                  | MN105537.1 |
| ITS seq of <i>Trichoderma</i> k | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | 98.32         | 96.14         | <i>T. koningiopsis</i> isolate XXTF7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence | MN602642.1 |
| ITS seq of <i>Trichoderma</i> v | <i>T. viride</i>                | 97.23         | 94.23         | <i>T. viride</i> strain CTCCSJ-A-SD33116 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence                                                                     | MF632117.1 |

(Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1994). Additionally, the fungi *Alternaria* sp. and *Ulocladium* sp. were found in Finca Billeben

No se encontró ningún género de hongos que estuviera en común en todas las localidades, los géneros *Mucor* y *Trichoderma* se encontraron en dos

(Guatemala). These fungi have been associated with leaf necrosis and have been reported to impact various tree species (Danelia *et al.*, 2021; Vannini and Vettrano, 2000).

In Finca Valle Alto, two species of *Fusarium* were identified: *F. equiseti* and *F. graminearum*. The latter is known to cause stalk rot in maize and primarily affects grasses, although it has been isolated from various plant families. Fungal spores are deposited and accumulate on leaves, serving as a potential source of inoculum for grasses (Miller *et al.*, 2007). In this particular case, the spores of this fungus were likely transported from neighboring maize plantations, as maize is commonly associated with pinabete in an agroforestry model (INAB, 2019).

No fungal genus was found to be shared across all locations. However, the genera *Mucor* and *Trichoderma* were observed in two out of the three locations, and these genera have previously been co-isolated from decomposing conifer leaves (Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1992).

Under microscopic observation of the biofilm scrapings, a close association between green algae and fungi was evident. Fungal mycelium with the accumulation of unicellular algae (Trebouxiophyceae) surrounding it was observed (Figure 6A and B), as well as fungal hyphae and spores adhering to filaments of the alga *Klebsormidium* sp. (Figure 6C and D). Terrestrial filamentous algae, including this genus, produce an extracellular matrix of polysaccharides that serve as attachment sites for other algae, cyanobacteria, and fungi (Warren *et al.*, 2019). Additionally, fungal hyphae adhere to other components of the biofilm, such as soil particles, contributing to their aggregation and compaction (Belnap *et al.*, 2003). The exact nature of the relationship, whether mutualistic, commensalistic, or parasitic,

de las tres localidades, y estos han sido aislados en conjunto en hojas de coníferas en descomposición (Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1992).

Al observar los raspados de la biopelícula bajo microscopio se encontró que las algas verdes y hongos están estrechamente relacionados. Se observó micelio de hongos con acumulación de algas unicelulares (Trebouxiophyceae) alrededor (Figura 6A y B), así como hifas y esporas de hongos adheridos a filamentos del alga *Klebsormidium* sp. (Figura 6C y D). Este y otros géneros de algas filamentosas terrestres producen una matriz extracelular de polisacáridos a la cual pueden adherirse otras algas, cianobacterias y hongos (Warren *et al.*, 2019). Además, las hifas de los hongos se adhieren a otros componentes de la biopelícula, como partículas de suelo, para agregarlos y compactarlos (Belnap *et al.*, 2003). Aún no está claro si existe una relación de mutualismo, comensalismo o parasitismo entre los microorganismos que conforman la biopelícula, lo cual deberá ser abordado en futuras investigaciones.

## CONCLUSIONES

La biopelícula que afecta a las plantaciones del pinabete en Guatemala está compuesta por algas epifitas, hongos y materia orgánica. En 15 árboles de pinabete en tres localidades se encontraron algas de los géneros *Desmococcus*, *Klebsormidium* y de la clase Trebouxiophyceae. Estas algas no son organismos parásitos del pinabete, sino que lo utilizan como soporte de manera similar a líquenes y otros epibiontes. También se encontraron hongos de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Ulocladium*, los cuales se han reportado como hongos patógenos, saprófitos y benéficos. Se encontró que la riqueza de especies

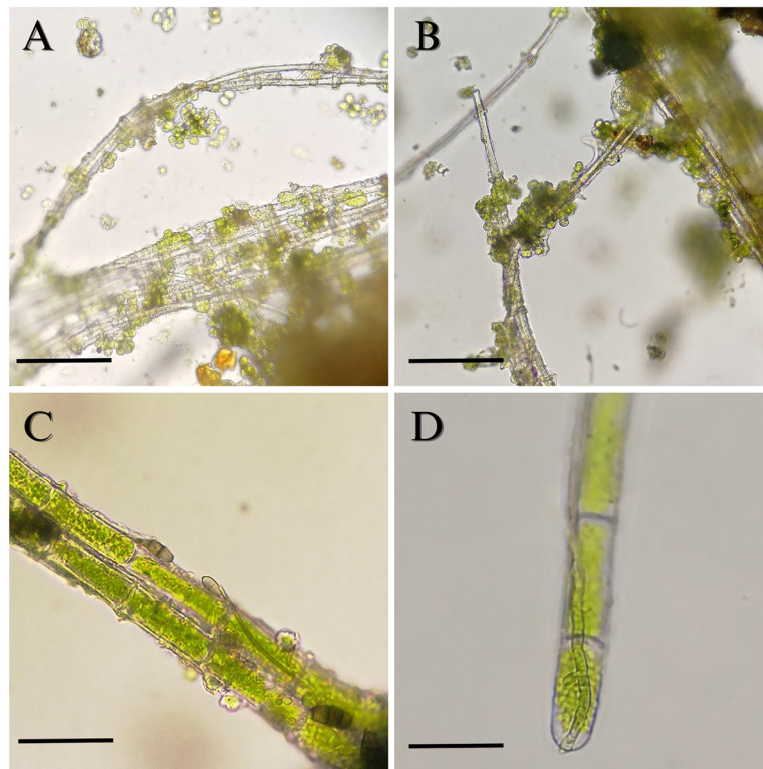


Figure 6. Scrapings of pinabete leaf biofilm seen under microscopy from pinabete leaves infested with the biofilm. A and B) Fungal mycelium surrounded by unicellular algae 400 X. C and D) *Klebsormidium* sp1 filaments surrounded by fungal hyphae and spores 400 X. Scale bar equals 10  $\mu$ m.

Figura 6. Raspados de la biopelícula de hojas de pinabete vistos bajo microscopio partir de hojas de pinabete infestados con la biopelícula. A y B) Micelio de hongos rodeado de algas unicelulares 400 X. C y D) Filamentos de *Klebsormidium* sp1 rodeados de hifas y esporas de hongos 400 X. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

among the microorganisms comprising the biofilm remains to be elucidated and should be the focus of future investigations.

## CONCLUSIONS

The biofilm affecting pinabete plantations in Guatemala is composed of epiphytic algae, fungi, and organic matter. Algae from the genera *Desmococcus*, *Klebsormidium*, and the class Trebouxiophyceae were found on 15 pinabete trees across three locations. These algae do not

de algas y hongos varía de acuerdo con la localidad, lo cual puede deberse a factores ambientales o antropogénicos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a Salvador Pira, José Billeb y Antonio Pineda, productores de pinabete, por apoyar en la colecta de muestras, así como a Patricia Herrera, María Bermúdez, Leyda Hernández, Julio Álvarez y Melvin Hernández, personal del Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, por su apoyo en el aislamiento y análisis genético de los hongos.

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

act as parasites but rather utilize pinabete as a substrate, akin to lichens and other epibionts. Fungi belonging to the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, and *Ulocladium* were also present, exhibiting a range of pathogenic, saprophytic, and beneficial characteristics. Furthermore, the species richness of both algae and fungi demonstrated variability among the locations, which could be attributed to environmental or anthropogenic factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Salvador Pira, José Billeb, and Antonio Pineda, pinabete producers, for their valuable support in sample collection. Grateful appreciation is also extended to Patricia Herrera, María Bermúdez, Leyda Hernández, Julio Álvarez, and Melvin Hernández from the Plant Protection Laboratory at the University of Valle de Guatemala for their assistance in fungal isolation and genetic analysis.

CITED LITERATURE

- AlgaeBase. 2023. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway: <https://www.algaebase.org/content/?tc=accept&undefined> (consulta, marzo 2023).
- Alwi I, Asmida I, Khairiyah S, Buyong F, Mohamad N, Daud D and Rusop M. 2015. Bark pH as a factor affecting the density of epiphytic terrestrial algae in Taman Wetland Putrajaya, Malaysia. *Journal of Applied and Physical Sciences* 1: 13-18. <https://doi.org/10.20474/japs-1.1.4>
- Andersen R. 2005. *Algal Culturing Techniques*. First Edition. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 592p. Disponible en línea: <https://www.elsevier.com/books/algal-culturing-techniques/andersen/978-0-12-088426-1>
- Archibald J, Simpson AG and Slamovits CH. 2017. *Handbook of the Protists*. Second Edition. Springer. Dordrecht, Netherlands. 1657p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0>
- Belnap J, Budel B and Lange OL. 2003. Biological Soil Crusts: Characteristics and distribution. Pp 3-30. *In*: Belnap J and Lange OL (eds.). *Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management*. Vol 150. Springer. Dordrecht, Netherlands. 479p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-56475-8>
- Carroll F, Muller E and Sutton BC. 1977. Preliminary Studies on the Incidence of Needle Endophytes in some European Conifers. *Sydowia* 29: 87-103. https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_29_0087-0103.pdf
- CONAP (Consejo Nacional de Áreas Protegidas). 2010. *Estrategia Nacional Para la Conservación del Pinabete (Abies guatemalensis Rehder) 2008-2017*. Documento técnico No. 80(01-2010). Guatemala, Guatemala. 106p. Disponible en línea: <https://conap.gob.gt/conservacion-del-pinabete/>
- Danelia I, Zaqariashvili N, Amiranashvili L, Badridze G and Kvitsiani S. 2021. The mycological study of conifers in Tbilisi and its surroundings. *Journal of Forest Science* 67: 464-476. <https://doi.org/10.17221/79/2021-JFS>
- Farr DF, Bills GF, Chamuris GP and Rossman AY. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. First Edition. APS Press. Minnesota, USA. 1252p. Disponible en línea: <https://my.apsnet.org/APSSStore/Product-Detail.aspx?WebsiteKey=2661527A-8D44-496C-A730-8CFEB6239BE7&iProductCode=40993>
- Freystein K and Reisser W. 2010. Green Biofilms on Tree Bark: more than just algae. Pp: 559-573. *In*: Sekbach J and Grube M (eds.). *Symbioses and Stress. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Vol. 17. Springer. Dordrecht, Netherlands. 615p. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0_29
- Glaser K, Baumann K, Leinweber P, Mikhailyuk T and Karsten U. 2018. Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences* 15: 4181-4192. <https://doi.org/10.5194/bg-15-4181-2018>
- Graham LE and Wilcox LW. 2009. *Algae*. Second Edition. PrenticeHall. New Jersey, USA. 1416p. Disponible en línea: <https://www.worldcat.org/title/algae/oclc/750763673>
- Hanackova Z, Koukol O, Stursova M, Kolarik M and Baldrian P. 2015. Fungal succession in the needle litter of a montane *Picea abies* forest investigated through strain isolation and molecular fingerprinting. *Fungal Ecology* 13: 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.09.007>
- Hayes AJ. 1965. Studies on the decomposition of coniferous leaf litter, II. Changes in external features and succession of microfungi. *Journal of Soil Science* 16: 242-258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1965.tb01435.x>
- Hoffmann L. 1989. Algae of terrestrial habitats. *Botanical Reviews* 55: 77-105. <https://doi.org/10.1007/BF02858529>
- INAB (Instituto Nacional de Bosques). 2018. *Manual de campo para el manejo sanitario de plantaciones de árboles navideños de pinabete*. Cooperativa Integral Agrícola Joya Hermosa de las Tres Cruces R.L. Guatemala, Guatemala. 26p. Disponible en línea: <https://inab.gob.gt/images/profor/Manual%20de%20Campo%20para%20el%20Manejo%20Sanitario%20de%20Plantaciones%20de%20arboles%20navidenos%20de%20Pinabete.pdf>

- INAB (Instituto Nacional de Bosques). 2019. Paquete Tecnológico Forestal para Pinabete *Abies guatemalensis* Rehder, versión 1.0. Serie técnica DT-032-2019. Departamento de Investigación Forestal. Guatemala, Guatemala. 58p. Disponible en línea: <https://www.inab.gob.gt/images/publicaciones/PTF%20PINABETE.pdf>
- John D and Rindi F. 2015. Filamentous (Nonconjugating) and Plantlike Green Algae. Pp: 375-427. In: Wehr JD, Sheath RG and Kociolek JP (eds.). Freshwater algae of North America: Ecology and Classification. Second Edition. Academic Press. Washington, USA. 1066p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00008-6>
- Kuhl A and Lorenzen H. 1964. Handling and Culturing of Chlorella. Pp: 159-187. In: Prescott DM (eds.). Methods in Cell Biology. Vol 1. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 464p. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62092-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62092-0)
- Ljaljević-Grbić M, Vukojević J, Subakov-Simić G, Krizmanić J and Stupar M. 2010. Biofilm forming cyanobacteria, algae and fungi in two historic monuments in Belgrade, Serbia. Archives of Biological Sciences 3: 625-631. <https://doi.org/10.2298/ABS1003625L>
- Laezza C, Salbitani G and Carfagna S. 2022. Fungal Contamination in Microalgal Cultivation: Biological and Biotechnological Aspects of Fungi-Microalgae Interaction. Journal of Fungi 10: 1099-1105. <https://doi.org/10.3390/jof8101099>
- Miller SS, Reid LM, Harris LJ. 2007. Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. Canadian Journal of Botany 85: 369-376. <https://doi.org/10.1139/B07-027>
- Murray M and Thompson W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 19: 4321-4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Neustupa J and Albrechtová J. 2003. Aerial algae on spruce needles in the Krusne Hory Mts., Czech Republic. Czech Phycology Olomouc 3: 161-167. <https://fottee.czechphycology.cz/pdfs/fot/2003/01/15.pdf>
- Novakova R and Neustupa J. 2015. Microalgal biofilms on common yew needles in relation to anthropogenic air pollution in urban Prague, Czech Republic. Science of the Total Environment 508: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.031>
- Phillips D and Burdekin DA. 1992. Diseases of Forest and Ornamental Trees. Second Edition. The MacMillan Press. London, England. 581p. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-10953-1>
- Poggio L. 2002. Epiphytic algae on Norway spruce needles in Sweden: geographical distribution, time-trends and influence of site factors. Department of Forest Soils, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 32p. Disponible en línea: https://stud.epsilon.slu.se/11831/1/poggio_1_171016.pdf
- Rindi F and Guiry MR. 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. Phycologia 3: 225-235. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-225.1>
- Schnurr P and Allen DG. 2015. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 52: 418-429. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.090>
- Sochting U and Sutton BC. 1997. *Scolecotecha cornuta* gen. et sp. nov. on needles of *Picea abies* from Denmark. Mycological Research 101: 1366-1370. <https://doi.org/10.1017/S0953756297004048>
- Sochting U. 1997. Epiphyllitic cover on spruce needles in Denmark. Annales Botanici Fennici 34: 157-164. <http://www.jstor.org/stable/23726495>
- Soto PA, Rodríguez AG, Fernández YL, Pedraza ME, López PL, Díaz CM y Fernández SP. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp.: Enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas (8): 1867-1880. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M and Cohen-Bazire G. 1971. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). Bacteriological Reviews 35: 171-205. <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>
- Stifterova A and Neustupa J. 2015. Community structure of corticolous microalgae within a single forest stand: evaluating the effects of bark surface pH and tree species. Fottea Olomouc 2: 113-122. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.013>
- Strandby U, Prado JP, Sorensen M and Kollmann J. 2006. Conservation and utilization of *Abies guatemalensis* Rehder – an endemic conifer in Central America. Biodiversity and Conservation 15: 3131-3151. <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-005-5405-x>
- Strandby U, Prado JP, Brauner U, Smith C, Nielsen C, Sorensen M and Kollmann J. 2008. Conservation through utilization: a case study of the vulnerable *Abies guatemalensis* in Guatemala. Oryx 2: 206-213. <https://doi.org/10.1017/S0030605308007588>
- Terhonen E, Marco T, Sun H, Jalkanen R, Kasanen R, Vuorinen M, Asiegbu F. 2011. The effect of latitude, season and needle-age on the mycota of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Finland. Silva Fennica 3: 301-317. <https://doi.org/10.14214/sf.104>
- Tokumasu S, Aoki T and Oberwinkler F. 1994. Fungal succession on fir needles in Germany. Mycoscience 35: 29-37. <https://doi.org/10.1007/BF02268525>
- Vannini A and Vettraino AM. 2000. *Ulocladium chartarum* as the causal agent of a leaf necrosis on *Quercus pubescens*. Forest Pathology 30: 297-303. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2000.00210.x>
- Videv PV, Gartner G, Uzunov BA, Dimitrova PH and Stoyneva-Gartner MP. 2017. Epimycotic Algae on the Medicinal Fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. International Journal of Advanced Research in Botany 3: 18-26. <http://dx.doi.org/10.20431/2455-4316.0302004>
- Wahl M. 2009. Epibiosis. Pp: 61-72. In: Wahl M (eds.). Marine Hard Bottom Communities. Ecological Studies. Vol 206.

- Springer. Dordrecht, Netherlands. 446p. https://doi.org/10.1007/b76710_4
- Warren SD, St. Clair LL, Stark LR, Lewis LA, Pombubpa N, Kurbessoianm T, Stajich JE, and Aanderud ZT. 2019. Reproduction and Dispersal of Biological Soil Crust Organisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* 344: 1-18. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00344>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315 –322. *In*: Junis MA (eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego, United States. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

Effect of adjuvants, fungicides and insecticides on the growth of *Trichoderma koningiopsis* Th003

Efecto de coadyuvantes, fungicidas e insecticidas sobre el crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003

Yimmy Alexander Zapata-Narváez*, Blanca Lucia Botina-Azain, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Agrosavia. Centro de Investigación Tibaitatá - Km 14 Vía Mosquera, Cundinamarca-Colombia.

*Corresponding author: jzapatan@agrosavia.co

Received: May 01, 2023.

Accepted: August 17, 2023.

Zapata-Narváez YA and Botina-Azain BL. 2023. Effect of adjuvants, fungicides and insecticides on the growth of *Trichoderma koningiopsis* Th003. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 412-433.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-1>

First DOI publication: August 24, 2023.

Primera publicación DOI: 24 de Agosto, 2023.

Abstract. The effect of 44 agrochemicals (fungicides, insecticides and adjuvants) on the mycelial growth and germination conidia of *Trichoderma koningiopsis* Th003 was determined by seeding of 5 mm discs of fungal mycelium in Sabouraud agar supplemented with each agrochemical and seeding of conidia suspended in solutions of agrochemicals in water agar. For the adjuvants, their effect on the phyllospheric establishment of *T. koningiopsis* Th003 was determined by following their population in cape gooseberry leaflets inoculated with the fungus suspended in them. Eight fungicides

Resumen. Se determinó el efecto de 44 agroquímicos (fungicidas, insecticidas y coadyuvantes) sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *Trichoderma koningiopsis* Th003, mediante siembra de discos de 5 mm de micelio hongo en agar Sabouraud suplementado con cada agroquímico y la siembra de conidios suspendidos en soluciones de los agroquímicos en agar agua. Para los coadyuvantes, se determinó su efecto en el establecimiento filosférico de *T. koningiopsis* Th003 siguiendo su población en foliolos de uchuva inoculados con el hongo suspendido en estos. Ocho fungicidas no inhibieron el crecimiento micelial del hongo o la germinación de sus conidios. Fenhexamid - Tebuconazol, Flutriafol y Kasugamicina lo inhibieron entre un 34 y 48% sin afectar la germinación, mientras que Thiram - Pirimetanil, Procloraz, Tiabendazol, Spiroxamina y Triadimenol - Tebuconazol inhibieron el crecimiento y Thiram - Pirimetanil y Dodine no permitieron la germinación de los conidios. Insecticidas y coadyuvantes presentaron una inhibición de hasta el 70% pero no afectaron la germinación de los conidios. No se

did not inhibit the fungus mycelial growth or the conidia germination. Fenhexamid - Tebuconazole, Flutriafol and Kasugamicina inhibited it between 34 and 48% without affecting germination, Thiram - Pyrimethanil, Prochloraz, Tiabendazol, Spiroxamina and Triadimenol - Tebuconazole inhibited the growth and Thiram - Pyrimethanil and Dodine did not allow conidia germination. Insecticides and adjuvants presented an inhibition of up to 70% but did not affect the conidia germination. No negative effects of the adjuvants on the phyllosphere establishment of *T. koningiopsis* Th003 were observed, recovering from the treatments approximately 1×10^3 CFU g⁻¹.

Keywords: Inhibition, germination, phyllosphere, resistance, tolerance.

Current agricultural production requires efficient alternatives for pest and disease control that contribute to sustainability within integrated crop management schemes. Additionally, the demands of a globalized market, such as certifications in Good Agricultural Practices like Global G.A.P or Rainforest Alliance, favor the use of environmentally friendly control methods for sustainable production (Sanderson-Bellamy *et al.*, 2016; Figueredo *et al.*, 2018; Niveló *et al.*, 2020).

One of these alternatives is the use of biopesticides formulated based on antagonistic microorganisms, which can be integrated into crop management strategies, helping to reduce the number of applications and active ingredients of chemical pesticides used in a crop cycle (Samada and Tambunan, 2020). In Colombia, one example is Tricotec® WG developed by the Colombian Corporation for Agricultural Research - AGROSAVIA. Its active ingredient is conidia of the fungus *Trichoderma koningiopsis*

observaron efectos negativos de los coadyuvantes en el establecimiento de *T. koningiopsis* Th003 en la filosfera, recuperando de los tratamientos aproximadamente 1×10^3 UFC g⁻¹.

Palabras clave: Inhibición, germinación, filosfera, resistencia, tolerancia.

La producción agrícola actual demanda para el control de plagas y enfermedades el uso de alternativas eficientes que contribuyan a su sostenibilidad enmarcada en esquemas de manejo integrado del cultivo, a la cual se suman los requerimientos de un mercado globalizado, exigiendo por ejemplo, certificaciones en Buenas Prácticas Agrícolas amparadas entre ellos en las normas Global G.A.P o Rain Forest, propendiendo al uso de alternativas de control ambientalmente amigables en pro de una producción agrícola sostenible (Sanderson-Bellamy *et al.*, 2016; Figueredo *et al.*, 2018; Niveló *et al.*, 2020).

Una de estas alternativas es el uso de bioplaguicidas formulados con base en microorganismos antagonistas, los cuales pueden integrarse en estrategias de manejo del cultivo, lo que contribuye a reducir el número de aplicaciones y de principios activos de plaguicidas químicos utilizados en un ciclo del cultivo (Samada y Tambunan, 2020). En Colombia, uno de estos bioplaguicidas es Tricotec® WG desarrollado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, cuyo principio activo son conidios del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003, este bioplaguicida cuenta con registro del Instituto Colombiano Agropecuario – ICA para su uso en cultivos de lechuga (*Lactuca sativa*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*), arándano (*Vaccinium corym-*

Th003. This biopesticide is registered by the Colombian Agricultural Institute - ICA for use on lettuce (*Lactuca sativa*), tomato (*Solanum lycopersicum*), rice (*Oryza sativa*), blueberry (*Vaccinium corymbosum*), strawberry (*Fragaria vesca*), blackberry (*Rubus glaucus*), potato (*Solanum tuberosum*) and ornamentals such as rose (*Rosa* spp.) to control *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. It has 50-65% efficacy depending on the production system (Moreno *et al.*, 2020).

However, agricultural production is subject to environmental, anthropogenic, and plant biological conditions which, in addition to yield impacts, can determine pest and disease incidence, sometimes occurring simultaneously.

Therefore, in addition to biopesticides, it is necessary to use chemically synthesized pesticides (whose suspensions or solutions are usually prepared with the addition of adjuvants that facilitate and improve their application and action) since the former can control one or several targets, but do not have a broad spectrum of action (Samada and Tambunan, 2020). For instance, with the applications of Tricotec® WG in rose cultivation, there is control over *B. cinerea*, but not over *Podosphaera pannosa* or *Peronospora sparsa*. For these pathogens, it is necessary to apply fungicides that control them (Debener and Byrne, 2014).

With this in mind, the objective of this work was to determine the effect of adjuvants, fungicides and insecticides used in production systems in which Tricotec® WG is registered for use, on the growth and conidia germination of *T. koningiopsis* Th003, as well as the effect of the adjuvants on the establishment of the fungus in the phyllosphere (as they are widely used agrochemicals for improving the activity of fungicides and insecticides) with a view to generating recommendations for use

bosum), fresa (*Fragaria vesca*), mora (*Rubus glaucus*), papa (*Solanum tuberosum*) y ornamentales como rosa (*Rosa* spp.), para el control de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, con una eficacia de control del 50 al 65% dependiendo del sistema productivo (Moreno *et al.*, 2020).

No obstante, la producción agrícola está sujeta a condiciones ambientales, antropogénicas o de la propia biología de la planta, que además de influir en su rendimiento, puede determinar la incidencia de plagas y enfermedades que, en ocasiones, se presentan simultáneamente.

Por lo anterior, para su control además de los bioplaguicidas, es necesario usar plaguicidas de síntesis química (cuyas suspensiones o soluciones usualmente se preparan con la adición de sustancias coadyuvantes que facilitan y mejoran su aplicación y acción) dado que el primero puede ejercer control sobre uno o varios blancos, pero no presentar un amplio espectro de acción (Samada y Tambunan, 2020), por ejemplo, con las aplicaciones de Tricotec® WG en el cultivo de rosa se realiza el control de *B. cinerea*, pero no el de *Podosphaera pannosa* o *Peronospora sparsa*, para lo cual es necesario aplicar fungicidas que controlen estos patógenos (Debener y Byrne, 2014).

Con esto en cuenta, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de coadyuvantes, fungicidas e insecticidas empleados en los sistemas productivos en los que Tricotec® WG cuenta con registro de uso, sobre el crecimiento y germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003, así como del efecto de los coadyuvantes en el establecimiento del hongo en la filósfera (por ser agroquímicos de amplio uso por mejorar la actividad de fungicidas e insecticidas) con miras a generar recomendaciones de uso de acuerdo con su potencial compatibilidad con los agroquímicos.

according to their potential compatibility with agrochemicals.

MATERIALS AND METHODS

This work was carried out at the Agricultural Microbiology Laboratory of the Tibaitatá Research Center of the Colombian Agricultural Research Corporation - AGROSAVIA.

Microorganism. To evaluate the effect of agrochemicals on the mycelial growth and germination of *T. koningiopsis* Th003, fungal cultures that had grown for seven and 10 days were used. These cultures were derived from the inoculation of a granule of the biopesticide Tricotec® WG onto potato dextrose agar (PDA) (Oxoid CM0139). Meanwhile, to assess the influence of adjuvants on the fungus's establishment in the phyllosphere, the commercial form of the biopesticide was utilized.

Agrochemicals evaluated. Twenty-seven fungicides used in crops for which Tricotec® WG is registered for use, 10 insecticides and 7 agricultural adjuvants were evaluated at the highest use dose reported in the technical data sheet of each agrochemical (Tables 1, 2 and 3).

Effect of agrochemicals on mycelial growth of *T. koningiopsis* Th003. Petri dishes were prepared with Dextrose Sabouraud agar (Scharlau 01-165-500) supplemented with each agrochemical, and the same agar without agrochemicals was used as a control. A 5 mm disk of *T. koningiopsis* Th003 mycelium taken from the fungal culture on PDA was placed in the center of each dish. The Petri dishes were incubated for 120 hours at 25 °C and at the end of this time the diameter of the colonies

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.

Microorganismo. Para determinar el efecto de los agroquímicos sobre el crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 se utilizaron cultivos del hongo con un crecimiento de siete y 10 días, obtenidos a partir de la siembra de un gránulo del bioplaguicida Tricotec® WG en agar papa dextrosa (PDA) (Oxoid CM0139), mientras que para determinar el efecto de los coadyuvantes en el establecimiento del hongo en la filosfera se utilizó el bioplaguicida en su formato comercial.

Agroquímicos evaluados. Se evaluaron 27 fungicidas utilizados para los cultivos en los que Tricotec® WG cuenta con registro de uso, 10 insecticidas y 7 coadyuvantes agrícolas, en la dosis de uso más alta reportada en la ficha técnica de cada agroquímico (Cuadros 1, 2 y 3).

Efecto de los agroquímicos sobre el crecimiento micelial de *T. koningiopsis* Th003. Se prepararon cajas Petri con agar Dextrosa Sabouraud (Scharlau 01-165-500) suplementado con cada agroquímico, como control se utilizó el mismo agar sin adición de agroquímicos. En el centro de cada caja se dispuso un disco de 5 mm de micelio de *T. koningiopsis* Th003 tomado del cultivo del hongo en PDA. Las cajas Petri se incubaron durante 120 horas a 25 °C y cumplido este tiempo se realizó la lectura del diámetro de las colonias. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula: $\text{Inhibición (\%)} = ((X - Y) / X) \times 100$, donde X = es el diámetro de la colonia de *T. koningiopsis*

Table 1. Technical information for the fungicides evaluated for their effect on the growth of *Trichoderma koningiopsis* Th003. Cuadro 1. Información técnica de los fungicidas considerados para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003.

| Fungicida | Grupo químico | Dosis | Mecanismo de acción | Fitopatógeno blanco |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|---|--|
| Mandipropamid | Amidas del ácido mandélico | 1 mL L ⁻¹ | Inhibe la síntesis de la pared celular en oomicetes | <i>Phytophthora infestans</i>
- <i>Peronospora destructor</i> -
<i>Peronospora sparsa</i> - <i>Plasmopara viticola</i> - <i>Peronospora pisi</i> |
| Dimetomorf | Amidas del ácido cinámico | 0.8 g L ⁻¹ | Inhibe la incorporación de aminoácidos a la síntesis de proteínas | <i>Cercospora apii</i> - <i>Septoria</i> sp. - <i>Venturia inaequalis</i> - <i>Sphaerotheca fuliginea</i> |
| Kasugamicina | Antibiótico aminoglucósido | 1.5 mL L ⁻¹ | Afecta la fosforilación oxidativa de las mitocondrias, inhibe la germinación de esporas, formación de apresorios y crecimiento micelial | <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> - <i>Phytophthora infestans</i> |
| Fluazinam | Fenil piridinaminas | 1 mL L ⁻¹ | Inhibe la síntesis de los esteroides | <i>Leveillula taurica</i> - <i>Stemphylium vesicarium</i> - <i>Uncinula necator</i> |
| Spiroxamina | Spiroketalaminas | 0.6 g L ⁻¹ | Disolución del estrato lipídico de la membrana llevando a la deshidratación de la célula | <i>Heterosporium echinulatum</i> - <i>Sphaerotheca pannosa</i> - <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Mycosphaerella fijiensis</i> - <i>Hemileia vastatrix</i> |
| Dodine | Guanidina | 1.6 mL L ⁻¹ | Inhibe la síntesis de lípidos, la germinación de esporas, la elongación del tubo germinal y formación del apresorio | <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Sphaerotheca pannosa</i> |
| Iminoctadine Tris (Albesilate) | di-guanidine | 0.75 cml L ⁻¹ | Inhibe la división celular a nivel de formación de tubulina | <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Cercospora apii</i> - <i>Lasioidiplodia theobromae</i> - <i>Sclerotium cepivorum</i> - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> - <i>Penicillium digitatum</i> |
| Tiabendazol | Benzimidazoles | 0.9 mL L ⁻¹ | Inhibidor de la respiración | <i>Phytophthora infestans</i> A1 - <i>Bremia lactucae</i> - <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> - <i>Pseudoperonospora cubensis</i> - <i>Peronospora destructor</i> - <i>Pythium ultimum</i> |
| Ciazofamida | Cianoimidazoles | 0.2 mL L ⁻¹ | Inhibe la síntesis del ergosterol. | <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> - <i>Alternaria solani</i> - <i>Cladosporium echinulatum</i> |
| Procloraz | Imidazol | 1.2 mL L ⁻¹ | Inhibición del crecimiento interfiriendo en la síntesis del ADN y ARN. | <i>Lasioidiplodia theobromae</i> - <i>Gaeumannomyces graminis</i> |

Table 1. Continued
Cuadro 1. Continúa

| Fungicida | Grupo químico | Dosis | Mecanismo de acción | Fitopatógeno blanco |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|--|---|
| Flutriafol | Triazol | 0.8 mL L ⁻¹ | Alteración de la síntesis del ergosterol, por la inhibición de la demetilación del esteroide | <i>Alternaria porri</i> - <i>Alternaria solani</i> - <i>Sphaerotheca pannosa</i> - <i>Heterosporium echinulatum</i> - <i>Puccinia horiana</i> - <i>Hemileia vastatrix</i> - <i>Helminthosporium oryzae</i> - <i>Sarocladium oryzae</i> - <i>Cercospora oryzae</i> - <i>Pyricularia grisea</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> - <i>Phakopsora pachyrhizi</i> - <i>Mycosphaerella fijiensis</i> |
| Hexaconazole | Triazol | 1 mL L ⁻¹ | Anti-esporulante, inhibidor de la síntesis de esteroides - ergosterol alterando la estructura y función de la membrana celular | <i>Erysiphe polygoni</i> - <i>Hemileia vastatrix</i> - <i>Puccinia pitteriana</i> - <i>Sphaerotheca pannosa</i> |
| Propiconazole | Triazol | 1.25 mL L ⁻¹ | Inhibe la síntesis del ergosterol y esteroides | <i>Helminthosporium</i> sp. - <i>Cercospora oryzae</i> |
| Triadimenol - Tebuconazole | Triazol | 1 mL L ⁻¹ | Inhibe la síntesis del esteroide y ergosterol | <i>Leveillula taurica</i> - <i>Pyricularia oryzae</i> - <i>Hemileia vastatrix</i> - <i>Puccinia asparagi</i> - <i>Podosphaera leucotricha</i> - <i>Alternaria solani</i> - <i>Lasiodiplodia theobromae</i> - <i>Uncinula necator</i> |
| Tebuconazole - Trifloxystrobin | Triazol - Estrobilina | 1 mL L ⁻¹ | Inhibe la síntesis de esteroide y detiene el transporte de electrones en la cadena respiratoria | <i>Pseudocercospora purpurea</i> - <i>Alternaria solani</i> - <i>Ramularia gossypii</i> - <i>Curvularia</i> spp. - <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>Helminthosporium</i> spp - <i>Colletotrichum</i> spp |
| Azoxistrobina - Difenconazole | Estrobilurina - Triazol | 1.25 mL L ⁻¹ | Azoxystrobin inhibe la respiración mitocondrial evitando la formación de energía (ATP), inhibe la germinación de esporas. Difenconazole inhibe la síntesis del ergosterol. | <i>Alternaria porri</i> - <i>Alternaria solani</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> - <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>Helminthosporium oryzae</i> - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> - <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Sphaerotheca pannosa</i> |
| Fenhexamid + Tebuconazole | Hidroxianilidas - Triazol | 2 mL L ⁻¹ | Inhibe la formación del tubo germinal y síntesis de ergosterol | <i>Botrytis cinerea</i> |
| Propamocarb - Fenamidona | Carbamatos - Imidazol | 2 mL L ⁻¹ | Fenamidone inhibe la respiración y formación de esporas. Propamocarb tiene acción antiesporulante e inhibe la síntesis de fosfolípidos y ácidos grasos. | <i>Peronospora viciae</i> - <i>Phytophthora infestans</i> - <i>Peronospora destructor</i> - <i>Pseudoperonospora cubensis</i> - <i>Peronospora sparsa</i> |

Table 1. Continued
Cuadro 1. Continúa

| Fungicida | Grupo químico | Dosis | Mecanismo de acción | Fitopatógeno blanco |
|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|---|---|
| Fenamidone - Fosetyl-Al | Imidazol - Organofosforado | 1 g L ⁻¹ | Interfiere en el proceso de respiración celular a nivel de mitocondrias y en la formación de ATP. | <i>Peronospora sparsa</i> |
| Fosetil - Propamocarb | Etil fosfonatos - Carbamatos | 2.5 mL L ⁻¹ | Inhibe la germinación, el crecimiento del micelio y esporulación. | <i>Pythium spp - Phytophthora spp - Phytophthora parasitica - Peronospora sparsa</i> |
| Fluopicolide + Propamocarb | Acylpicolides - Carbamatos | 2 mL L ⁻¹ | Altera las espectrinas perturbando la estructura celular, afectando la estabilidad del cito esqueleto con la posterior muerte. | <i>Bremia lactucae - Peronospora destructor - Peronospora sparsa - Pseudoeranospora cubensis - Phytophthora capsici - Phytophthora infestans - Phytophthora palmivora</i> |
| Pyrimethanil -Iprodione | Pirimidina - Dicarboximidias | 1 mL L ⁻¹ | Pyrimethanil inhibe la secreción de enzimas. Iprodione inhibe la germinación, elongación del tubo germinal, producción de conidios y crecimiento micelial | <i>Botrytis cinerea</i> |
| Fluopyram + Pyrimethanil | Piridiniletibenzamidas - Pirimidina | 1 mL L ⁻¹ | Inhibidor del succinato deshidrogenasa actuando en la cadena respiratoria e inhibe la secreción de enzimas. | <i>Botrytis cinerea - Cladosporium spp. - Mycosphaerella fijiensis</i> |
| Fludioxonil + Ciprodinil | Fenilpirroles - Pirimidina | 0.6 g L ⁻¹ | Ciprodinil afecta la síntesis de metionina y la secreción de enzimas hidrolíticas. Fludioxonil inhibe la proteína kinasa en la ruta de transducción de la señal de osmosensibilidad | <i>Botrytis cinerea</i> |
| Thiram + Pyrimethanil | Ditiocarbamato - Pirimidina | 2 mL L ⁻¹ | Inhibe la secreción de enzimas hidrolíticas, la germinación de esporas y el crecimiento micelial | <i>Botrytis cinerea</i> |
| Metalaxil-M - Mancozeb | Anilida - Ditiocarbamatos | 3 g L ⁻¹ | Inhibe la respiración y la germinación de las esporas | <i>Plasmopara viticola - Peronospora sparsa - Phytophthora infestans</i> |

The information contained in this table comes from the technical data sheets of the suppliers of the commercial products. / La información contenida en la presente tabla proviene de las fichas técnicas de los proveedores de los productos comerciales.

Table 2. Technical information for the insecticides evaluated for their effect on the growth of *Trichoderma koningiopsis* Th003.Cuadro 2. Información técnica de los insecticidas considerados para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003.

| Insecticida | Grupo químico | Dosis | Mecanismo de acción | Patógeno blanco |
|--------------------------------|--|------------------------|--|---|
| Spinosad | Naturalite | 0.5 mL L ⁻¹ | Actúa por contacto e ingestión, causando parálisis. Activa el receptor de la acetilcolina nicotínica, en diferente sitio que la nicotina o imidacloprid. | <i>Frankliniella occidentalis</i> -
<i>Liriomyza</i> spp. - <i>Thrips palmi</i>
- <i>Tuta absoluta</i> - <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| Dinotefuran | Neonicotinoides | 0.5 mL L ⁻¹ | Interfiere la neurotransmisión a través de los receptores nicotínicos. | <i>Frankliniella occidentalis</i> -
<i>Oebalus insularis</i> |
| Sulfoxaflor | Sulfoxaminas | 1 mL L ⁻¹ | Neurotóxico trabaja en el sistema nervioso central en los receptores nicotínicos de acetilcolina genero excitación generalizada, parálisis, postración y finalmente la muerte de las plagas. | <i>Collaria</i> sp. - <i>Trialeurodes vaporariorum</i> - <i>Trialeurodes vaporariorum</i> - <i>Empoasca kraemer</i> - <i>Aphis gossypii</i>
- <i>Bemisia tabaci</i> - <i>Oebalus poecilus</i> - <i>Diaphorina citri</i>
Kuwayama |
| Spiromesifen | Derivados del ácido tetrónico (ketoenoles) | 0.5 mL L ⁻¹ | Interfiere con la síntesis de lípidos, afectando el desarrollo y fecundidad. | <i>Oligonychus yothersi</i> -
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
- <i>Bemisia tabaci</i> - <i>Tetranychus urticae</i> - |
| Malathion | Organofosforados | 1 mL L ⁻¹ | Inhibidor de la acetilcolinesterasa | <i>Frankliniella occidentalis</i>
- <i>Anthonomus grandis</i> -
<i>Thrips tabaci</i> - <i>Trialeurodes vaporariorum</i> - <i>Collaria scenica</i> |
| Beta-cyfluthrin + Imidacloprid | Neonicotinoide - Piretroide | 1 mL L ⁻¹ | Se une en forma postsináptica a los receptores nicotinérgicos y afecta el canal del sodio, en el sistema nervioso. | <i>Premnotrypes vorax</i> -
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
- <i>Anthonomus grandis</i> - <i>Eutheola bidentata</i> - <i>Spodoptera frugiperda</i> - <i>Oebalus poecilus</i>
- <i>Thrips tabaci</i> - <i>Thrips palmi</i>
- <i>Gryllotalpa hexadactyla</i>
- <i>Frankliniella occidentalis</i> -
<i>Diaphorina citri</i> |
| Chlorfenapir | Pirroles | 0.6 mL L ⁻¹ | Interrumpe la generación de energía por la liberación y extracción de protones H ⁺ antes de llegar al ATP. | <i>Frankliniella occidentalis</i> -
<i>Tetranychus urticae</i> - <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) |
| Metoxifenocide | Benzoilhidracina | 1 mL L ⁻¹ | Mimético de la hormona de la muda (ecdisona) que acelera el proceso de muda y con acción ovicida | <i>Anticarsia gemmatilis</i> -
<i>Rachiplusia nu</i> - <i>Helicoverpa gelotopoeon</i> - <i>Spodoptera frugiperda</i> - <i>Heliothis virescens</i> -
<i>Cydia pomonella</i> - <i>Tuta absoluta</i>
- <i>Lobesia botrana</i> |

Table 2. Continued
Cuadro 2. Continúa

| Insecticida | Grupo químico | Dosis | Mecanismo de acción | Patógeno blanco |
|--------------|---------------|------------------------|--|---|
| Piriproxifen | Fenil éter | 0.6 mL L ⁻¹ | Interferencia de la hormona juvenil “HJ” causando la inhibición de metamorfosis, de embriogénesis, de la reproducción, del desarrollo larvario y perturbación de la diapausa | <i>Bemisia tabaci</i> - <i>Trialeurodes vaporariorum</i> - <i>Liriomyza</i> sp. - <i>Frankliniella occidentalis</i> - <i>Thrips tabaci</i> - <i>Heliothrips haemorrhoidalis</i> - <i>Bombacoccus aguacatae</i> - <i>Hemiberlesia lataniae</i> - <i>Aspidiotus nerii</i> - <i>Aleuropleurocelus</i> spp. |
| Permetrina | Piretroide | 0.6 mL L ⁻¹ | Interrumpe la función de las neuronas por interacción con los canales de sodio. | <i>Spodoptera frugiperda</i> - <i>Epitrix</i> sp. - <i>Tecia solanivora</i> - <i>Plutella xylostella</i> - <i>Tuta absoluta</i> |

The information contained in this table comes from the technical data sheets of the suppliers of the commercial products. / La información contenida en la presente tabla proviene de las fichas técnicas de los proveedores de los productos comerciales.

Table 3. Technical information for the adjuvants evaluated for their effect on the growth of *Trichoderma koningiopsis* Th003.
Cuadro 3. Información técnica de los coadyuvantes considerados para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003.

| Nombre comercial | Principio activo | Dosis |
|------------------|--|------------------------|
| Agrotin® SL | Polisacáridos, alcoholes polivinílicos, siliconas | 1 mL L ⁻¹ |
| HIPOTENSOR SYS | Polietilenglicol - Polidimetilsiloxano, fosfatos mono y dipotásicos | 1 mL L ⁻¹ |
| MF REDUX® | Alquil alcohol poliglicol éter | 1 mL L ⁻¹ |
| Fluyex® | Alcohol etoxilado modificado | 5 mL L ⁻¹ |
| INEX-A® | Alquil Polieter Alcohol Etoxilado, Alquil Poliglicol, Aril Polietoxietanol | 4 mL L ⁻¹ |
| Carrier® | Ácidos carboxílicos insaturados y glicéridos saturados | 1.5 mL L ⁻¹ |
| Bioplant® | Aril polietoxietanol - Poliglucósido etoxilado - | 1 mL L ⁻¹ |

The information contained in this table comes from the technical data sheets of the suppliers of the commercial products. / La información contenida en la presente tabla proviene de las fichas técnicas de los proveedores de los productos comerciales.

was read. With the data obtained, the percentage of inhibition was calculated using the formula: Inhibition (%) = $((X - Y) / X) \times 100$, where X = is the diameter of the colony of *T. koningiopsis* Th003 in the control dishes, Y = the diameter of the colony of *T. koningiopsis* Th003 in the dishes supplemented with each of the agrochemicals.

Effect of agrochemicals on the germination of *T. koningiopsis* Th003 conidia. The conidia were collected from a fungal culture on PDA, making a suspension that was adjusted to a concentration of 1×10^7 conidia mL^{-1} using the Neubauer chamber counting technique. Subsequently, 1 mL was taken and transferred to Erlenmeyers flasks containing 20 mL of the solutions of each agrochemical according to the established doses (Tables 1, 2 and 3). The fungal conidia suspended in water were used as a control. The inoculated solutions were left to stand for one hour at 17 °C, simulating the time they could remain in a fumigation equipment during application. Subsequently, 100 μL were taken from each Erlenmeyer and placed in Petri dishes with water agar, spreading them over their surface with a Drigalsky rake. The dishes were incubated for 24 hours at 25 °C and after this, the number of germinated and non-germinated conidia was read by counting 100 conidia on a 1 cm^2 agar square, taking three squares from each dish. The germination percentage was determined using the formula: Germination (%) = $(\text{Germinated conidia} / \text{Total conidia}) \times 100$. A spore was considered as a germinated spore when the length of the germ tube was at least 50% of the length of the non-germinated spore (Muy-Rangel *et al.*, 2018).

Effect of adjuvants on the establishment of *T. koningiopsis* Th003 in the phyllosphere. Suspensions of Tricotec® WG (at a concentration of 1×10^6 conidia mL^{-1}) were prepared in solutions

Th003 en las cajas del control, Y = el diámetro de la colonia de *T. koningiopsis* Th003 en las cajas suplementadas con cada uno de los agroquímicos.

Efecto de los agroquímicos sobre la germinación de conidios *T. koningiopsis* Th003. De un cultivo del hongo en PDA se colectaron los conidios realizando una suspensión que se ajustó a una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} mediante la técnica recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente, se tomó 1 mL que se transfirió a matraces Erlenmeyers que contenían 20 mL de las soluciones de cada agroquímico según las dosis establecidas (Cuadros 1, 2 y 3). Como control se tuvieron los conidios del hongo suspendidos en agua. Las soluciones inoculadas se dejaron en reposo por una hora a 17 °C simulando el tiempo que podrían permanecer en un equipo de fumigación durante su aplicación. Posteriormente, de cada Erlenmeyer se tomaron 100 μL que se dispusieron en cajas Petri con agar agua, esparciéndolos sobre su superficie con un rastrillo Drigalsky. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 25 °C y posterior a esto, se realizó la lectura del número de conidios germinados y no germinados mediante el conteo de 100 conidios en un cuadro de agar de 1 cm^2 tomando de cada caja tres cuadros. El porcentaje de germinación se determinó utilizando la fórmula: Germinación (%) = $(\text{Conidios germinados} / \text{Conidios totales}) \times 100$. Se consideró como una espora germinada cuando la longitud del tubo germinativo fue de al menos el 50% de la longitud de la espora sin germinar (Muy-Rangel *et al.*, 2018).

Efecto de los coadyuvantes en el establecimiento de *T. koningiopsis* Th003 en la filósfera. Se prepararon suspensiones de Tricotec® WG (a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1}) en soluciones de cada coadyuvante, dejándolas en reposo durante una hora, luego se aplicaron en plantas de uchuva

of each adjuvant, left to stand for one hour, and then applied to five-month-old cape gooseberry (*Physalis peruviana*) plants in a field crop. The biopesticide prepared in water at the concentration described above was applied as a control. Seven days later, 10 leaves were taken from the plants and packed in paper bags for analysis in the laboratory. The leaves were cut into 1 cm² fragments using a sterile stainless steel punch, 10 g were taken and placed in Erlenmeyers with 90 mL of 0.1% Tween 80 (stock suspension) and left in constant agitation at 150 rpm for one hour. Subsequently, a 1:10 dilution was made from each, which was vortexed for 30 seconds. From each stock suspension and dilution, 100 µL were taken and placed in Petri dishes with Rose Bengal + chloramphenicol agar (Oxoid CM0549) (three dishes per dilution), the aliquot was distributed homogeneously with a Drigalsky rake. The dishes were incubated at 25 °C for 5 days, after which colony forming units (CFU) were counted and the results expressed as Log (CFU g⁻¹).

Experimental design and data analysis. The assays were established under a completely randomized experimental design. The experimental unit (EU) corresponded to a Petri dish, with 10 replicates for the evaluation of the effect of agrochemicals on mycelial growth and three replicates for the evaluation of the effect on conidial germination. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Fisher's LSD test (*= P>0.05) using Statistix 10.0 statistical software.

RESULTS

Effect of agrochemicals on mycelial growth of *T. koningiopsis* Th003. In experiments testing the impact of fungicides on mycelial growth,

(*Physalis peruviana*) de cinco meses de edad que se encontraban en un cultivo en campo. Como control se aplicó el bioplaguicida preparado en agua en la concentración descrita anteriormente. Siete días después, de las plantas se tomaron 10 hojas, empacándolas en bolsa de papel para su análisis en el laboratorio. Las hojas se cortaron en fragmentos de 1 cm² empleando un sacabocado de acero inoxidable estéril, se tomaron 10 g y se dispusieron en Erlenmeyers con 90 mL de Tween 80 al 0.1% (suspensión madre) dejándolos en agitación constante a 150 rpm durante una hora. Posteriormente, de cada uno se realizó una dilución 1:10, que se agitó en vórtex durante 30 segundos. De cada suspensión madre y dilución se tomaron 100 µL que se dispusieron en cajas Petri con agar Rosa de Bengala + cloranfenicol (Oxoid CM0549) (tres cajas por dilución), la alícuota se distribuyó de forma homogénea con un rastrillo Drigalsky. Las cajas se incubaron a 25 °C durante 5 días y posterior a este se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) expresando los resultados como Log (UFC g⁻¹).

Diseño experimental y análisis de datos. Los ensayos se establecieron bajo un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental (UE) correspondió a una caja Petri, teniendo 10 repeticiones para la evaluación del efecto de los agroquímicos sobre el crecimiento micelial y tres para la evaluación del efecto sobre germinación de los conidios. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y las medias se compararon mediante una prueba LSD de Fisher (*= P>0.05) usando el software estadístico Statistix 10.0.

RESULTADOS

Efecto de los agroquímicos sobre el crecimiento micelial de *T. koningiopsis* Th003. En presencia

no inhibition was observed in the presence of Cyazofamid, Dimethomorph, Fenamidone - Fosetyl-Al, Fosetyl - Propamocarb, Fluopicolide - Propamocarb, Hexaconazole, Mandipropamid, and Propamocarb - Fenamidone. There were no significant differences between these fungicides and the control (Figure 1).

However, when the fungus encountered a medium containing Flutriafol, Kasugamycin, and

de Ciazofamida, Dimetomorf, Fenamidone - Fosetyl-Al, Fosetil - Propamocarb, Fluopicolide - Propamocarb, Hexaconazole, Mandipropamid y Propamocarb – Fenamidona, no se observó inhibición del crecimiento micelial, así como diferencias significativas entre estos fungicidas y el control (Figura 1).

Al exponer el hongo en presencia del medio con Flutriafol, Kasugamicina y Fenhexamid - Tebuconazol

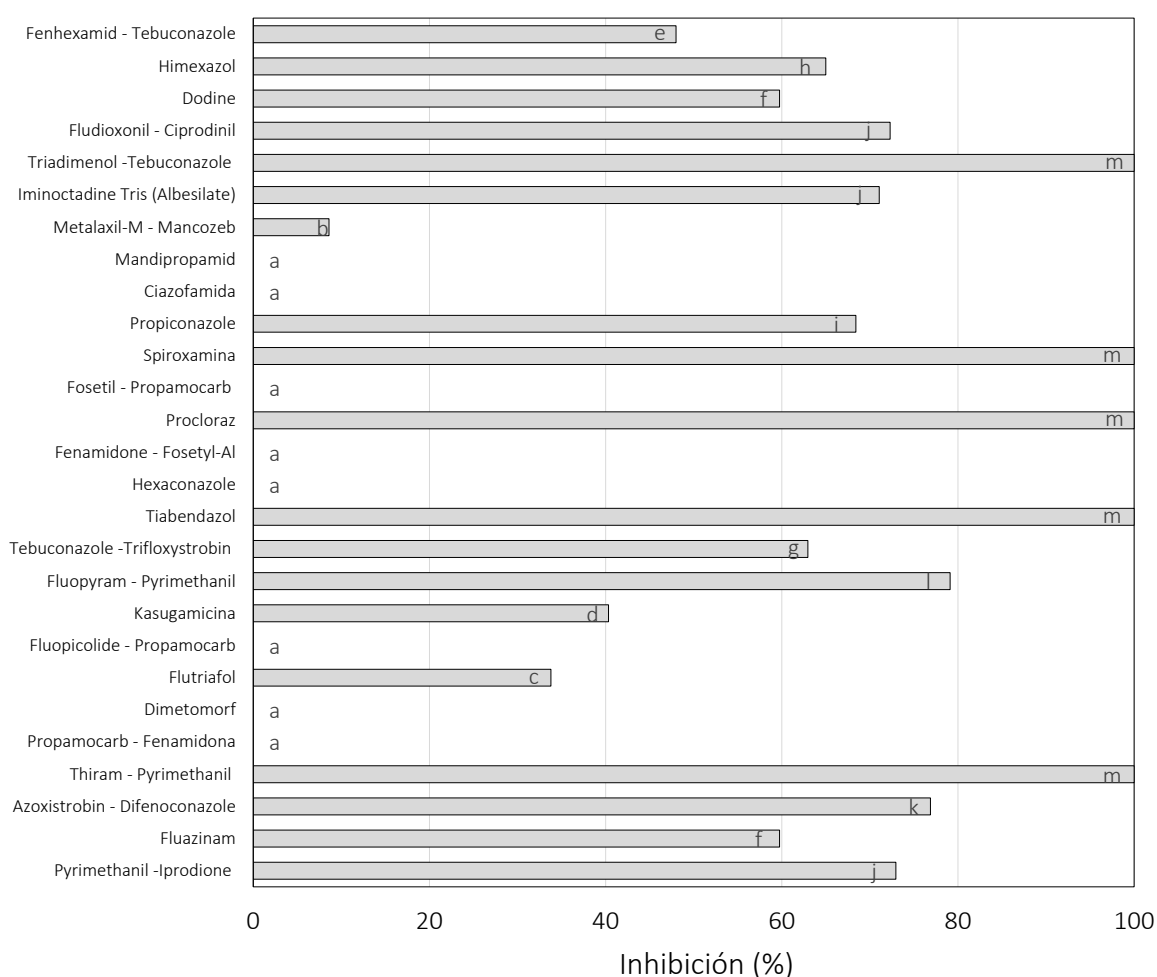


Figure 1. Inhibition of mycelial growth of *T. koningiopsis* Th003 on Sabouraud agar supplemented with fungicides. Columns with the same letter are not significantly different according to Fisher LSD test (*= P>0.05).

Figura 1. Inhibición del crecimiento micelial de *T. koningiopsis* Th003 en agar Sabouraud suplementado con fungicidas. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= P>0.05).

Fenhexamid - Tebuconazole, there was a growth inhibition ranging from 34 to 48%. In the presence of Azoxystrobin - Difenconazole, Dodine, Fluazinam, Fludioxonil - Cyprodinil, Pyrimethanil - Iprodione, Iminoctadine Tris (Albesilate), Himexazole, Propiconazole, and Tebuconazole - Trifloxystrobin, the inhibition ranged from 60 to 79% (Figure 1). While Thiram - Pyrimethanil, Prochloraz, Thiabendazole, Spiroxamine, and Triadimenol -Tebuconazole completely halted the growth of *T. koningiopsis* Th003 (Figure 1).

In relation to insecticides, only Beta-Cyfluthrin - Imidacloprid Permethrin and Malathion reduced fungal growth, inhibiting it by 23% and 44% respectively. These were also the sole insecticides to exhibit significant differences compared to the control (Figure 2).

la inhibición de su crecimiento estuvo entre el 34 y 48%, mientras que al exponerse a Azoxistrobina - Difenconazole, Dodine, Fluazinam, Fludioxonil - Ciprodinil, Pyrimethanil - Iprodione, Iminoctadine Tris (Albesilate), Himexazol, Propiconazole y Tebuconazole - Trifloxystrobin la inhibición del crecimiento micelial estuvo entre un 60 y 79% (Figura 1). Entre tanto, en presencia de Thiram - Pirimetanil, Procloraz, Tiabendazol, Spiroxamina y Triadimenol -Tebuconazole el crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 fue inhibido totalmente (Figura 1).

Con respecto a los insecticidas, solo en presencia de Beta-Cyuthrin - Imidacloprid Permetrina (inhibición del 23%) y Malathion (inhibición del 44%) se observó reducción del crecimiento del hongo, siendo a su vez los únicos insecticidas que

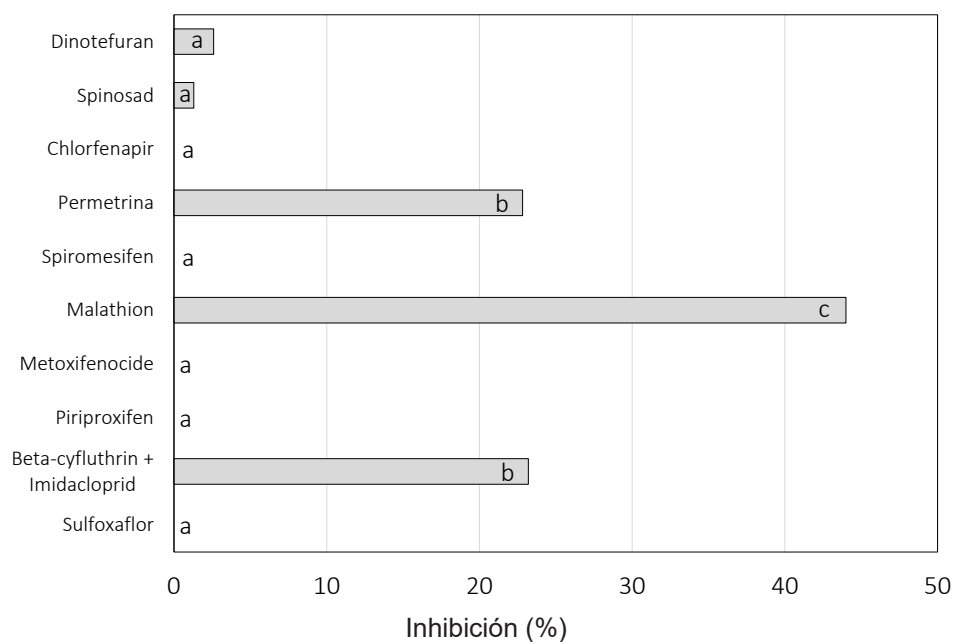


Figure 2. Inhibition of mycelial growth of *T. koningiopsis* Th003 on Sabouraud agar supplemented with insecticides. Columns with the same letter are not significantly different according to Fisher LSD test (*= P>0.05).

Figura 2. Inhibición del crecimiento micelial de *T. koningiopsis* Th003 en agar Sabouraud suplementado con insecticidas. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= P>0.05).

Regarding the adjuvants, Carrier® had no effect on the mycelial growth of *T. koningiopsis* Th003. However, other adjuvants inhibited growth between 44 and 70%, with Fluyex® showing the maximum inhibition (Figure 3).

presentaron diferencias significativas con respecto al control (Figura 2).

En cuanto a los coadyuvantes, Carrier® no inhibió el crecimiento micelial de *T. koningiopsis* Th003, mientras que los restantes lo hicieron entre

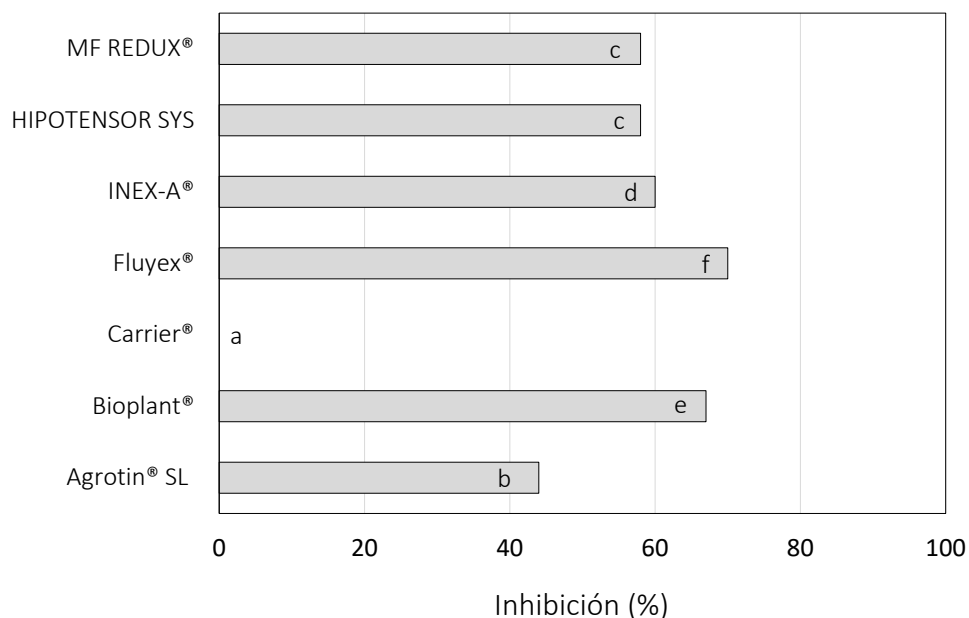


Figure 3. Inhibition of mycelial growth of *T. koningiopsis* Th003 on Sabouraud agar supplemented with adjuvants. Columns with the same letter are not significantly different according to Fisher LSD test (*= P>0.05).

Figura 3. Inhibición del crecimiento micelial de *T. koningiopsis* Th003 en agar Sabouraud suplementado con coadyuvantes. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= P>0.05).

Effect of agrochemicals on the germination of conidia of *T. koningiopsis* Th003. In the presence of Dodine, Metalaxyl-M - Mancozeb and Thiram - Pyrimethanil, conidial germination was totally inhibited, while Iminoctadine Tris (Albesilate) only allowed it in 14% and Fluazinam and Plocloraz in 63% (Figure 4). Meanwhile, in the presence of the other fungicides the germination of conidia was $\geq 87\%$, 13 of them without presenting significant differences with respect to the control.

As for the insecticides, the conidia in the presence of Chlorfenapyr presented a germination

un 44 y 70%, siendo en Fluyex® donde se observó la mayor inhibición (Figura 3).

Efecto de los agroquímicos sobre la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003. En presencia de Dodine, Metalaxil-M – Mancozeb y Thiram - Pirimetanil la germinación de los conidios fue inhibida totalmente, mientras que Iminoctadine Tris (Albesilate) solo la permitió en un 14% y Fluazinam y Plocloraz en un 63% (Figura 4). Entre tanto, en presencia de los demás fungicidas la

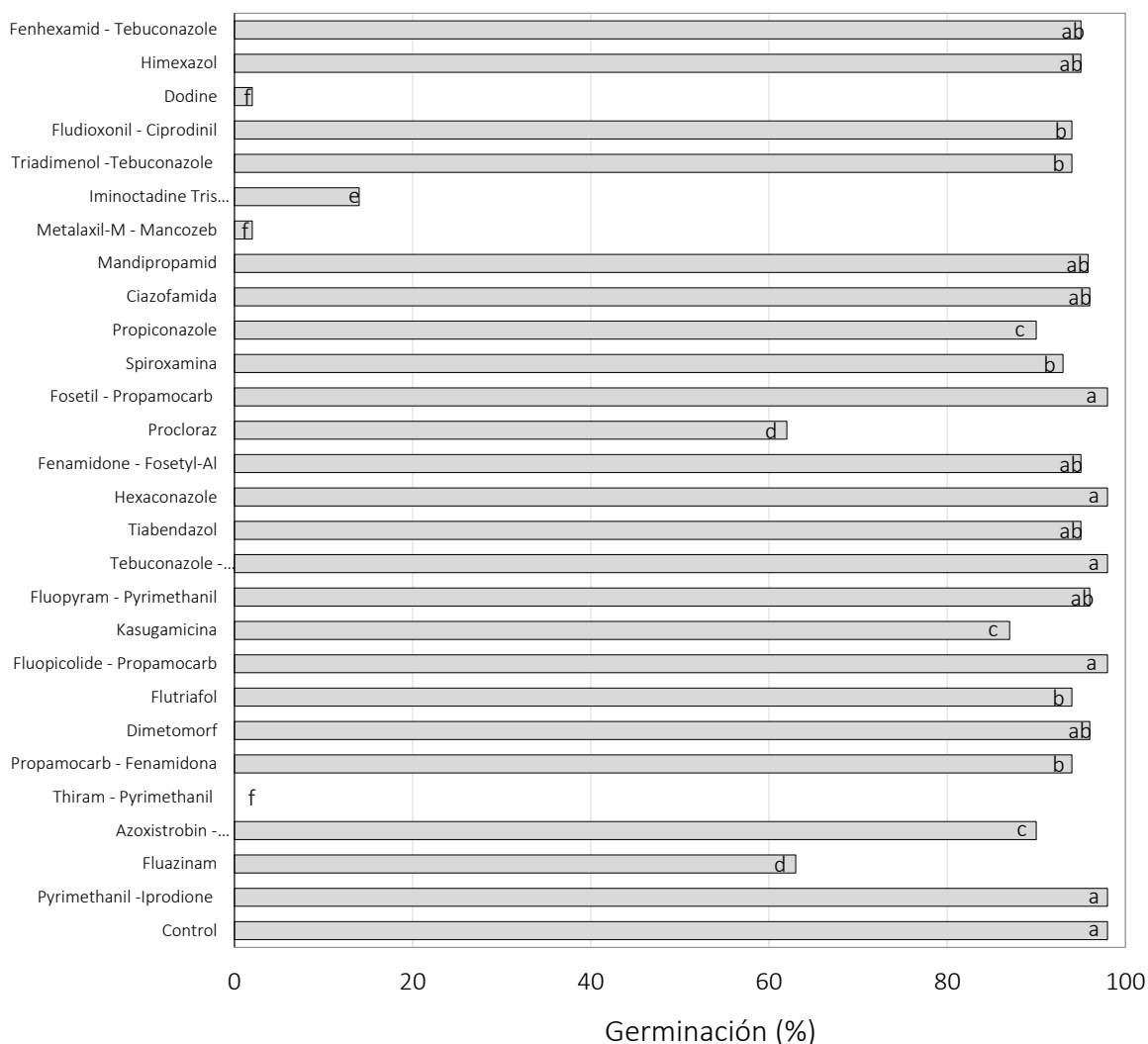


Figure 4. Germination of *T. koningiopsis* Th003 conidia exposed to fungicide solutions. Columns with the same letter are not significantly different according to Fisher LSD test (*= P>0.05).

Figura 4. Germinación de conidios de *T. koningiopsis* Th003 en exposición a soluciones de fungicidas. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= P>0.05).

of 84%, lower than that obtained with the other insecticides, where a germination of $\geq 97\%$ was obtained, without presenting significant differences with respect to the control (Figure 5). With respect to the adjuvants, five of them presented significant differences with respect to the control; however, germination in the presence of all of them was $\geq 93\%$ (Figure 6).

germinación de los conidios fue $\geq 87\%$, 13 de ellos sin presentar diferencias significativas con respecto al control.

En cuanto a los insecticidas, los conidios en presencia de Clorfenapir presentaron una germinación del 84%, menor a la obtenida con los demás insecticidas, en los cuales se obtuvieron germinaciones $\geq 97\%$, sin presentar diferencias significativas con

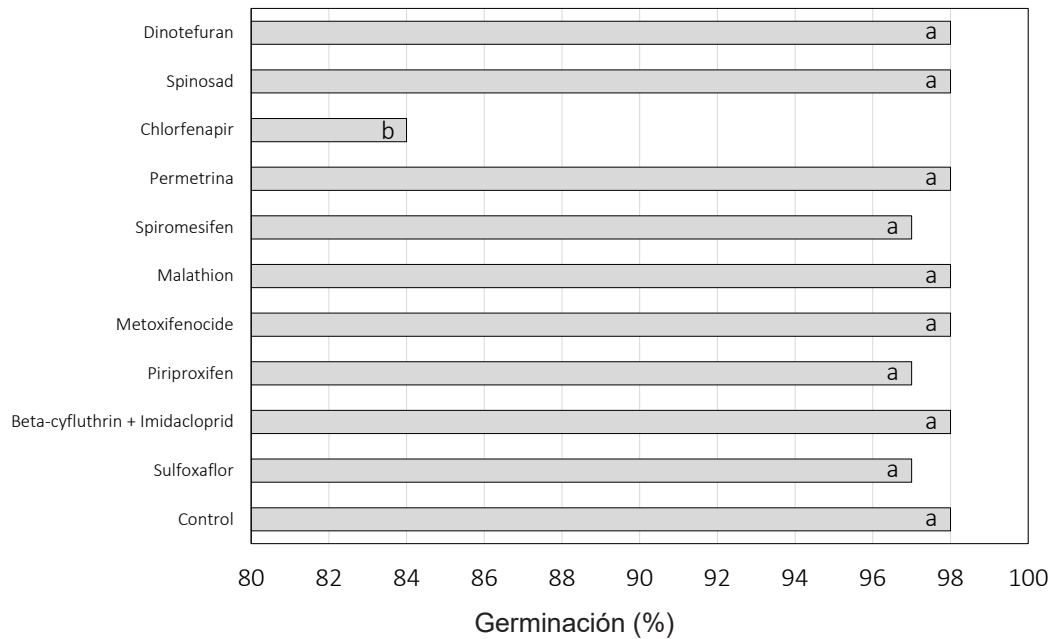


Figure 5. Germination of conidia of *T. koningiopsis* Th003 exposed to insecticide solutions. Columns with the same letter are not significantly different according to Fisher LSD test (*= P>0.05).

Figura 5. Germinación de conidios de *T. koningiopsis* Th003 en exposición a soluciones de insecticidas. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= P>0.05).

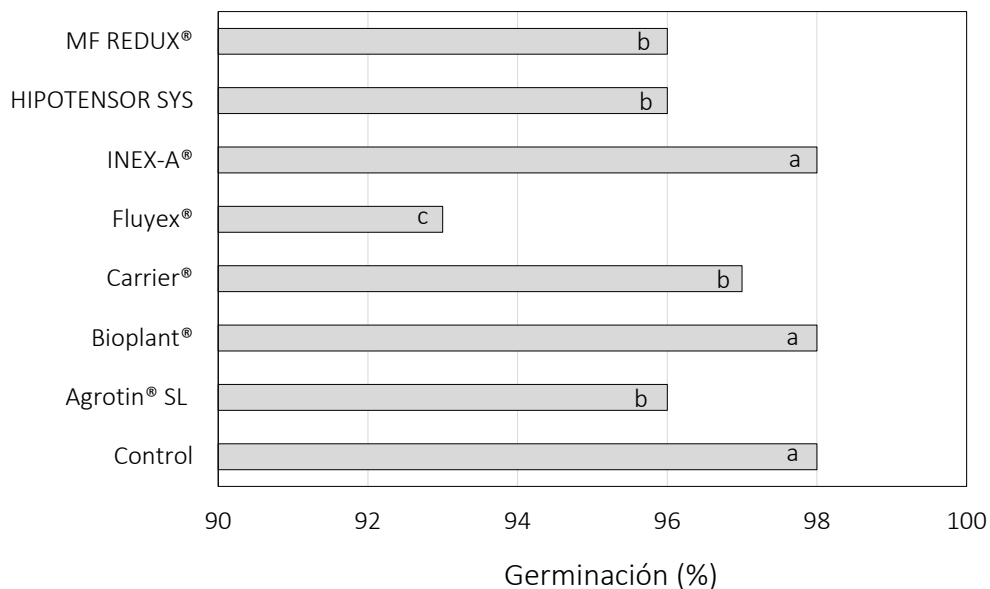


Figure 6. Germination of conidia of *T. koningiopsis* Th003 exposed to adjuvant solutions. Columns with the same letter are not significantly different according to Fisher LSD test (*= P>0.05).

Figura 6. Germinación de conidios de *T. koningiopsis* Th003 en exposición a soluciones de coadyuvantes. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (*= P>0.05).

Effect of adjuvants on the establishment of *T. koningiopsis* Th003 in the phyllosphere. The highest populations of *T. koningiopsis* Th003 were recovered in the treatments corresponding to Agrotin® SL and HIPOTENSOR, with means of 3.5 and 3.3 log (CFU g⁻¹) respectively, showing significant differences compared to the other treatments. The control presented a mean of 2.9 log (CFU g⁻¹) and together with Fluyex® and INEX-A®, with means of 2.7 log (CFU g⁻¹), showed the lowest values for recovered populations of the fungus (Figure 7).

respecto al control (Figura 5). Con respecto a los coadyuvantes, cinco de ellos presentaron diferencias significativas con respecto al control; no obstante, la germinación en presencia de todos ellos fue $\geq 93\%$ (Figura 6).

Efecto de los coadyuvantes en el establecimiento de *T. koningiopsis* Th003 en la filosfera. Las mayores poblaciones de *T. koningiopsis* Th003 se recuperaron en los tratamientos correspondientes a Agrotin® SL e HIPOTENSOR con medias de 3.5 y

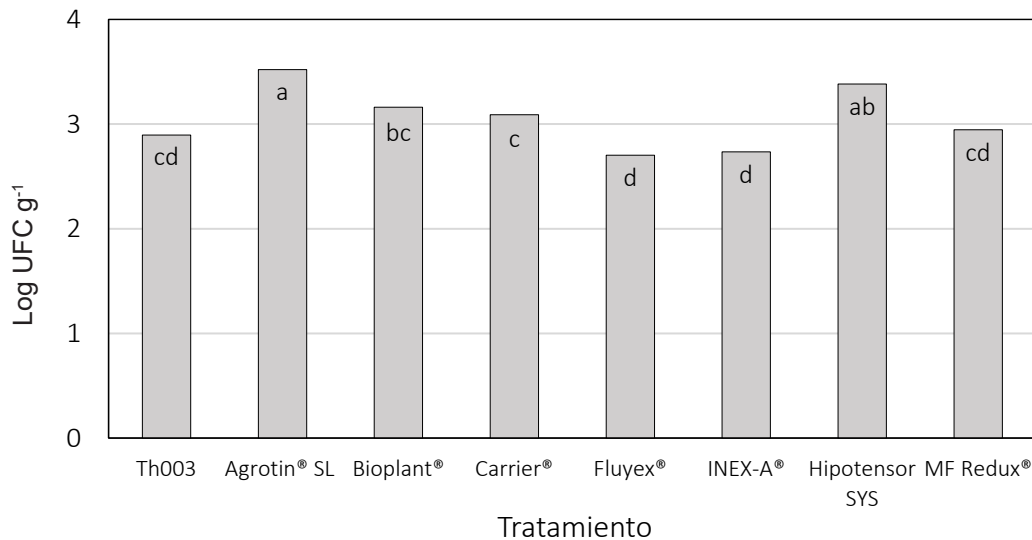


Figure 7. Populations of *T. koningiopsis* Th003 recovered from the cape gooseberry phyllosphere seven days after spraying the biopesticide Tricotec® WG prepared in suspensions of the adjuvants.

Figura 7. Poblaciones de *T. koningiopsis* Th003 recuperadas de la filosfera de uchuva siete días después de la aspersión del bioplaguicida Tricotec® WG preparado en las suspensiones de los coadyuvantes.

DISCUSSION

The fungicides used for controlling oomycete phytopathogens (Cyazofamid, Dimethomorph, Fenamidone - Fosetyl-AI, Fosetyl - Propamocarb, Fluopicolide - Propamocarb, Hexaconazole,

3.3 log (UFC g⁻¹) respectivamente, presentando diferencias significativas con los demás tratamientos. El control presentó una media de 2.9 log (UFC g⁻¹) y junto a Fluyex® e INEX-A® con medias de 2.7 log (UFC g⁻¹) presentaron los menores valores para las poblaciones recuperadas del hongo (Figura 7).

Mandipropamid, Propamocarb - Fenamidone) did not affect mycelial growth or conidial germination of *T. koningiopsis* Th003 (with the exception of Metalaxyl-M - Mancozeb). Oomycetes have a cell wall consisting of cellulose and sitosterol as membrane lipid (Restrepo *et al.*, 2016), unlike fungi which have chitin and ergosterol (Gow *et al.*, 2017). Since some of these fungicides negatively affect the oomycete cell wall, the lack of cellulose and sitosterol in *T. koningiopsis* Th003 may explain why they did not inhibit growth.

Meanwhile, other fungicides used against *B. cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., or *Rhizoctonia solani*, inhibited mycelial growth up to 100%, indicating toxic effects. However, only Dodine, Metalaxyl-M - Mancozeb, Thiram - Pyrimethanil and Iminoctadine Tris (Albesilate) affected conidial germination, while with others, germination was less impacted, perhaps due to tolerance as reported for some *Trichoderma* species against certain fungicides (Escudero-Leyva *et al.*, 2022).

Agrochemicals used as adjuvants and insecticides can stimulate or inhibit mycelial growth as well as the germination of conidia of antagonistic fungi (Rashid *et al.*, 2012; Sain *et al.*, 2022). These effects depend on the chemical properties of the agrochemical, the concentration used, and the biology of the fungus. For example, a study by Sabogal-Vargas *et al.* (2023) showed that the insecticide chlorpyrifos at concentrations of 960, 1,200 and 1,440 mg L⁻¹ increasingly inhibited mycelial growth of *Trichoderma asperellum* TCA3, *T. asperellum* TCA21 and *T. harzianum* TCA23. However, germination of *T. asperellum* TCA21 conidia was not inhibited. The inhibition of conidia germination in the other strains was attributed to an accumulation of self-inhibitors of germination, causing a state of dormancy (Sabogal-Vargas *et al.*, 2023).

DISCUSIÓN

Los fungicidas utilizados para el control de fitopatógenos oomicetos (Ciazofamida, Dimetomorf, Fenamidone - Fosetyl-Al, Fosetil - Propamocarb, Fluopicolide - Propamocarb, Hexaconazole, Mandipropamid, Propamocarb - Fenamidona) no afectaron el crecimiento micelial o la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 (a excepción de Metalaxil-M - Mancozeb). Los oomicetos poseen una pared celular conformada por celulosa y sitosterol como lípido de membrana (Restrepo *et al.*, 2016) a diferencia de una pared con quitina y una membrana con ergosterol en los hongos (Gow *et al.*, 2017), siendo posible que, ya que algunos de estos fungicidas tienen un efecto negativo sobre la pared de los oomicetos, la ausencia de celulosa y sitosterol en *T. koningiopsis* Th003 pudo en parte ser la causa de que estos fungicidas no afectaran negativamente su crecimiento.

Entre tanto, los demás fungicidas, utilizados en el control de *B. cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., o *Rhizoctonia solani*, inhibieron el crecimiento micelial, algunos incluso hasta en un 100%, mostrando un efecto tóxico de los principios activos; sin embargo, solo Dodine, Metalaxil-M - Mancozeb, Thiram - Pirimetaniil e Iminoctadine Tris (Albesilate) afectaron la germinación de los conidios, hasta en un 100%, mientras que con el resto, la germinación no se afectó severamente, quizás por un efecto de tolerancia a los principios activos evaluados, fenómeno reportado para fungicidas como Azoxystrobin, Clorotalonil, Ciproconazol, Propineb y Tolclofos-metil en diferentes especies de *Trichoderma* (Escudero-Leyva *et al.*, 2022).

Agroquímicos como coadyuvantes e insecticidas, pueden estimular o inhibir el crecimiento micelial así como la germinación de conidios de hongos antagonistas (Rashid *et al.*, 2012; Sain *et*

For some insecticides and adjuvants, the inhibitory effect on mycelial growth but not conidial germination has been related to alteration of the electrostatic charge of the fungal surface and potential elimination of the mucous layer covering the conidia. This may occur by interruption of metabolism in the cell wall and its effect on membrane permeability (Clifford and Hislop, 1975; Rashid *et al.*, 2012; Fait *et al.*, 2019). The active ingredient of the biopesticide is conidia of the fungus. When applied in the phyllosphere suspended in adjuvant solutions, the conidia germinated and the fungus became established despite the presence of adjuvants and insecticides. Consequently, populations of *T. koningiopsis* Th003 recovered were higher or similar to the control. Thus, both the adjuvants and insecticides evaluated could potentially be applied together with the biopesticide, a condition that also applies to the fungicides that did not affect conidial germination.

The tolerance and resistance of a fungus to fungicides is considered an evolutionary process, where exposure to an active ingredient exerts selection pressure on a population, killing the initial wild population but not the altered mutant population. Thus, overexposure accelerates changes towards tolerant and resistant populations, which have developed mechanisms such as alteration or overexpression of the fungicide target site, detoxification, and exclusion or expulsion from the site of action (FRAC, 2019).

However, the tolerance that *T. koningiopsis* Th003 showed for some agrochemicals, particularly fungicides, may be innate to the fungus's metabolism. In the production of the Tricotec® WG biopesticide, the fungus used is not exposed to any agrochemicals, as it comes from a germplasm bank rather than being recovered from the environment. This implies that *T. koningiopsis* Th003 may possess inherent stress tolerance genes, as reported

et al., 2022), efectos dependen de las propiedades químicas del agroquímico, concentración de uso y de la biología del hongo, en este sentido estudios desarrollados por Sabogal-Vargas *et al.* (2023) demostraron que el insecticida clorpirifos en concentraciones de 960, 1.200 y 1.440 mg. L⁻¹ inhibía el crecimiento micelial de *Trichoderma asperellum* TCA3, *T. asperellum* TCA21 y *Trichoderma harzianum* TCA23 conforme su concentración aumentó, no obstante, la germinación de los conidios de *T. asperellum* TCA21 no se vio afectada, relacionando la inhibición de la germinación de los conidios en las otras cepas a una acumulación de auto - inhibidores de la germinación, que provocó en estos un estado de dormancia (Sabogal-Vargas *et al.*, 2023).

Para algunos insecticidas y coadyuvantes, el efecto inhibitorio se ha relacionado con la alteración de la carga electrostática de la superficie fúngica y la potencial eliminación de la capa mucosa que cubre los conidios, por la interrupción del metabolismo en la pared celular y su afecto en la permeabilidad de la membrana (Clifford y Hislop, 1975; Rashid *et al.*, 2012; Fait *et al.*, 2019); lo que explicaría particularmente porque el crecimiento micelial se inhibió, pero no la germinación de los conidios. El principio activo del bioplaguicida son conidios del hongo y cuando se aplicaron en la filosfera suspendidos en las soluciones de los coadyuvantes, germinaron y el hongo se estableció en la filosfera, razón por la cual, las poblaciones de *T. koningiopsis* Th003 recuperadas fueron superiores o similares al control; con lo cual se puede proponer que tanto los coadyuvantes como los insecticidas evaluados pueden ser aplicados junto con el bioplaguicida, condición que se aplica con los fungicidas que no afectaron la germinación de los conidios.

La tolerancia y resistencia de un hongo principalmente a los fungicidas es considerado como un proceso evolutivo, donde la exposición a un

for other *Trichoderma* species. It may also produce degradative enzymes or proteins responsible for regulating agrochemical degradation processes, allowing it to tolerate and grow in their presence (Tripathi *et al.*, 2013; Ramangouda *et al.*, 2023).

CONCLUSIONS

The fungicides used to control oomycetes (Cyazofamid, Dimethomorph, Fenamidone - Fosetyl-Al, Fosetyl - Propamocarb, Fluopicolide - Propamocarb, Hexaconazole, Mandipropamid, Propamocarb - Fenamidone) did not affect mycelial growth or conidia germination of *T. koningiopsis* Th003. In contrast, those used against ascomycetes or basidiomycetes showed some inhibition. Mycelial growth was completely inhibited by Thiram - Pyrimethanil, Prochloraz, Thiabendazole, Spiroxamine and Triadimenol -Tebuconazole. Thiram - Pyrimethanil, Dodine and Iminoctadine Tris (Albesilate) also inhibited conidial germination. The insecticides Beta-Cyfluthrin - Imidacloprid, Permethrin and Malathion inhibited mycelial growth but did not affect conidia germination. Most adjuvants inhibited mycelial growth by 44-70% but did not impact conidia germination or fungal establishment on the leaf surface. Carrier[®] was the exception with no effect. Thus, considering integrated pest management strategies, it is possible to mix adjuvants, insecticides and fungicides that did not inhibit *T. koningiopsis* Th003 conidia germination with the biopesticide.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA for funding the project "Adjustment and optimization of bioproducts phase III", which allowed the development of this work.

principio activo ejerce presión de selección sobre una población, matando a la población inicial (silvestre) pero no a la alterada (mutante), de esta forma la sobreexposición acelera los cambios hacia poblaciones tolerantes y resistentes, las cuales han desarrollan mecanismos como la alteración o sobreexpresión del sitio de acción del fungicida, su detoxificación y su exclusión o expulsión desde el sitio de acción (FRAC, 2019).

No obstante, la tolerancia que *T. koningiopsis* Th003 mostró para algunos agroquímicos, en particular fungicidas, puede deberse al metabolismo del hongo, ya que, en la fabricación del bioplaguicida Tricotec[®] WG el hongo utilizado no se expone a ningún agroquímico, empleándose para esto un banco de germoplasma y no el hongo recuperado del ambiente, lo cual puede suponer tal como se ha reportado para otras especies de *Trichoderma* la presencia de genes de tolerancia al estrés en *T. koningiopsis* Th003, así como la producción de enzimas degradadoras o proteínas responsables de regular procesos de degradación del agroquímico, permitiéndole tolerarlo y crecer en su presencia (Tripathi *et al.*, 2013; Ramangouda *et al.*, 2023).

CONCLUSIONES

Los fungicidas utilizados en el control de oomicetos (Ciazofamida, Dimetomorf, Fenamidone - Fosetyl-Al, Fosetil - Propamocarb, Fluopicolide - Propamocarb, Hexaconazole, Mandipropamid, Propamocarb - Fenamidona) no afectaron el crecimiento micelial o la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003, mientras que aquellos utilizados en el control de ascomicetos o basidiomicetos presentaron alguna inhibición, no obstante, en presencia de Thiram - Pirimetanil, Procloraz, Tiabendazol, Spiroxamina y Triadimenol -Tebuconazole, el crecimiento fue inhibió totalmente. Thiram

CITED LITERATURE

- Clifford DR and Hislop EC. 1975. Surfactants for the control of apple mildew. *Pesticide Science* 6(4): 409–418. <https://doi.org/10.1002/ps.2780060409>
- Debener T and Byrne DH. 2014. Disease resistance breeding in rose: Current status and potential of biotechnological tools. *Plant Science* 228: 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.005>
- Escudero-Leyva E, Alfaro-Vargas P, Muñoz-Arrieta R, Charpentier-Alfaro C, Granados-Montero MdM, Valverde-Madrigal KS, Pérez-Villanueva M, Méndez-Rivera M, Rodríguez-Rodríguez CE, Chaverri P and Mora-Villalobos JA. 2022. Tolerance and biological removal of fungicides by *Trichoderma* species isolated from the endosphere of wild rubiaceae Plants. *Frontiers in Agronomy* 3:772170. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.772170>
- Fait ME, Bakas L, Garrote GL, Morcelle S and Saparrat M. 2019. Cationic surfactants as antifungal agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 103: 97–112 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9467-6>
- Figueredo CA, Rincón NS and Salazar NS. 2018. Caracterización del cumplimiento inicial de la Norma Global G.A.P., aplicada a pequeños agricultores de Duitama. *Entre Ciencia e Ingeniería* 12(23): 32-39. <http://dx.doi.org/10.31908/19098367.3700>
- Fungicide Resistance Action Committee – FRAC. 2019. Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción. FRAC España 25p. https://fmcagro.es/img/folleto_Clasificaci%C3%B3n%20de%20fungicidas%20y%20bactericidas%20seg%C3%BAn%20el%20modo%20de%20acci%C3%B3n
- Gow NAR, Latge JP, Munro CA. 2017. The fungal cell wall: Structure, biosynthesis and function. *Microbiology Spectrum* 5(3): 1-25. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Moreno-Velandia CA, Izquierdo-García LF, Zapata-Narváez YA, Beltrán-Acosta CR and Zuluaga-Mogollón MV. 2020. Tricotec® WG Biofungicida. Recomendaciones de uso y patógenos blanco. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria–AGROSAVIA. 48 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/36526>
- Muy-Rangel MD, Osuna-Valle JR, García-Estrada RS, San Martín-Hernández C, Quintana-Obregón EA. 2017. In vitro antifungal activity of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) against *Alternaria tenuissima*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 162-171. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1708-3>
- Nivelo K, Pacheco A and Pupo J. 2020. Global GAP y su complemento GRASP: Filosofía de Responsabilidad Social Empresarial del Sector Agroalimentario. 593 Digital Publisher CEIT 5(3): 93-111. <https://doi.org/10.33386/593dp.2020.3.221>

- Pirimetanil, Dodine y Iminoctadine Tris (Albesilate) inhibieron la germinación de los conidios. Insecticidas como Beta- Ciflutrina - Imidacloprid, Permetrina y Malatión inhibieron el crecimiento; sin embargo, no afectaron la germinación de conidios. Respecto a los coadyuvantes a excepción de Carrier®, inhibieron el crecimiento micelial entre un 44 y 70% pero no afectaron la germinación de los conidios o el establecimiento del hongo en la superficie foliar. De este modo y pensando en el desarrollo de estrategias de manejo integrado, es posible mezclar los coadyuvantes, insecticidas y los fungicidas que no afectaron la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 con el bioplaguicida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA por la financiación del proyecto “Ajuste y optimización de bioproductos fase III” que permitió el desarrollo de este trabajo.

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

- Ramangouda G, MK Naik, RB Nitnavare, R Yeshvekar, J Bhattacharya, Bhatnagar-Mathur P and Sharma M. 2023. Genetic enhancement of *Trichoderma asperellum* biocontrol potentials and carbendazim tolerance for chickpea dry root rot disease management. *PLoS ONE* 18(1): e0280064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280064>
- Rashid M, Sheikhi A, Naseri B, Ghazavi M and Barari H. 2012. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with the insecticides fipronil, pyriproxyfen and hexaflumuron. *Journal of Entomological Society of Iran* 31(2): 29-37. [https://jesi.areeo.ac.ir/article\\_105469.html?lang=en](https://jesi.areeo.ac.ir/article_105469.html?lang=en)
- Restrepo S, Enciso J, Tabima J and Riaño DM. 2016. Evolutionary history of the group formerly known as protists using a Phylogenomics approach. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 40(154): 147-160. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.277>

- Sabogal-Vargas AM, Wilson-Krugg J, Rojas-Villacorta W, De La Cruz-Noriega M, Otiniano N. M., Rojas-Flores, S., & Mendoza-Villanueva, K. 2023. *In vitro* compatibility of three native isolates of *Trichoderma* with the insecticide chlorpyrifos. *Applied Sciences* 13(2): 811. <https://doi.org/10.3390/app13020811>
- Sain SK, Monga D, Kranthi S, Hiremani NS, Nagrale DT, Kumar R and Prasad YG. 2022. Evaluation of the bioefficacy and insecticide compatibility of entomopathogens for management of whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) on upland cotton under laboratory and polyhouse conditions. *Neotropical Entomology* 51(4): 600-612. <https://doi.org/10.1007/s13744-022-00964-9>
- Samada LH and Tambunan, US. 2020. Biopesticides as Promising Alternatives to Chemical Pesticides: A Review of Their Current and Future Status. *OnLine Journal of Biological Sciences* 20 (2): 66-76. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2020.66.76>
- Sanderson-Bellamy A, Svensson O, van den Brink P and Tedengren M. 2016. What is in a label? Rainforest-Alliance certified banana production versus non-certified conventional banana production. *Global Ecology and Conservation* 7: 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.05.002>
- Tripathi P, Singh PC, Mishra A, Chauhan PS, Dwivedi S, Bais RT and Tripathi RD. 2013. *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean-up. *Clean Technologies and Environmental Policy* 15: 541-550. <https://doi.org/10.1007/s10098-012-0553-7>

# Gene silencing induced by the vector EuMY-YP $\Delta$ CHS4 during the *Fusarium* sp. - *Nicotiana benthamiana* interaction

## Silenciamiento génico inducido por el vector EuMY-YP $\Delta$ CHS4 durante la interacción *Fusarium* sp.-*Nicotiana benthamiana*

**Nidia Esther Hau-Yama**, <sup>1</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; CP 97205, Mérida, Yucatán, México; **Marianne Soledad Luna-Rivero**, Escuela de Ciencias de la Salud- Universidad Marista de Mérida, Periférico Norte Tablaje Catastral 13941 Carretera Mérida-Progreso, C.P. 97300 Mérida, Yucatán, México; **Blondy Beatriz Canto-Canché**, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; CP 97205, **Yereni Minero-García**<sup>1</sup>; **Cecilia Hernández-Zepeda**, Unidad de Ciencias del Agua, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 8 No 39 SM 64 Mz 29 77500 Cancún, Quintana Roo, México; **Diana Sánchez-Rangel**, Investigadora por México-CONAHCYT, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, Col. El Haya, CP 91070, Xalapa, Veracruz, México; **Oscar Alberto Moreno-Valenzuela**\*<sup>1</sup>.

\*Corresponding Author: oamv@cicy.mx

Received: March 24, 2023.

Accepted: August 13, 2023.

Hau-Yama NE, Luna-Rivero MS, Canto-Canché BB, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C, Sánchez-Rangel D and Moreno-Valenzuela OA. 2023. Gene silencing induced by the vector EuMY-YP $\Delta$ CHS4 during the *Fusarium* sp. - *Nicotiana benthamiana* interaction. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 434-459.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-4>

First DOI publication: August 28, 2023.

Primera publicación DOI: 28 de Agosto, 2023.

**Abstract.** In the literature, RNA-based interference methods have been proposed for the control of pathogenic fungi in plants, such as virus-mediated silencing (VIGS). The objective of this work was to evaluate the functionality and efficiency of the VIGS EuMV-YP $\Delta$ CHS4 vector,

**Resumen.** En la literatura, se han propuesto métodos basados en el ARN de interferencia para el control de hongos patógenos en plantas, como el silenciamiento mediado por virus (VIGS). En este trabajo se evaluó la funcionalidad y la eficiencia del vector VIGS EuMV-YP $\Delta$ CHS4, el cual contiene un fragmento de la secuencia del gen de la quitina sintasa 4 (*CHS4*) de *Fusarium* sp. y fue construido a partir del vector EuMV-YP: $\Delta$ AV1. Se evaluó el vector VIGS en dos condiciones en plantas de *Nicotiana benthamiana*: plantas con inoculación previa con *Fusarium* sp. y en plantas con inoculación del hongo posterior a la inoculación del vector VIGS. Los resultados mostraron que la aplicación de EuMV-YP $\Delta$ CHS4 en ambos tratamientos provocó un retardo en la caída de hojas durante los primeros días de la infección y una disminución significativa del daño en el tallo de las plantas



which contains a fragment of the *Fusarium* sp. chitin synthase 4 (*CHS4*) gene sequence, and was constructed from the EuMV-YP vector:ΔAV1. The VIGS vector was evaluated under two conditions in *Nicotiana benthamiana* plants previously inoculated with *Fusarium* sp. and in plants with inoculation after the inoculation of the VIGS vector. The results showed that in both treatments with the EuMV-YPΔ*CHS4*, a delay in leaf fall during the first days of infection and a decrease in the stem damage of almost one centimeter, compared to the control infected with the fungus. In addition, a reduction of up to 30% in the relative expression of the *CHS4* gene was observed. These results suggest that the application of VIGS vectors may be efficient as a strategy to protect plants against *Fusarium* sp.

**Keywords:** Silencing RNA, *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán peninsula, cross-kingdom

Plant diseases caused by fungal pathogens are a significant threat to food security (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020). Fungi are estimated to be accountable for losses exceeding 65% in global crop yield, an annual escalation attributed to factors like shifts in agricultural practices and excessive usage of synthetic fungicides. These elements contribute to the emergence of resistant strains, complicating the control and early-stage detection of fungal infections (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020; Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sharma and Sharma, 2020).

Prominent among the soil-borne fungal pathogens affecting plants are those belonging to the *Fusarium* genus, known for their pronounced pathogenicity. These fungi have been associated with numerous diseases across more than 200 crop

infectadas, comparadas con el control infectado con el hongo. Además, se observó una reducción de hasta 30% en la expresión relativa del gen *CHS4*. Estos resultados sugieren que la aplicación de los vectores VIGS puede ser una estrategia eficiente para proteger a las plantas contra *Fusarium* sp.

**Palabras clave:** ARN de silenciamiento, *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán península, entre reinos “cross-kingdom”

Las enfermedades ocasionadas en plantas por patógenos fúngicos son una de las amenazas principales en la seguridad alimentaria (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020). Se estima que los hongos son responsables de pérdidas de más del 65% en los cultivos en todo el mundo, las cuales año con año van en aumento debido a factores como el cambio en las prácticas agrícolas, el uso desmedido de fungicidas sintéticos, entre otros, lo que genera la aparición de cepas resistentes y la dificultad para controlar e identificar las infecciones fúngicas en etapas tempranas (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020; Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sharma y Sharma, 2020).

Entre los principales hongos patógenos del suelo que afectan a las plantas se encuentran los hongos del género *Fusarium*, los cuales se caracterizan por ser altamente patogénicos y se han relacionado con diferentes enfermedades en más de 200 especies de cultivos a nivel mundial, ocasionando graves pérdidas económicas (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020; Summerell, 2019). Estos hongos se caracterizan por invadir el tejido vascular de las plantas e inducir síntomas como el oscurecimiento y la pudrición de la raíz y el tallo, el marchitamiento, el retraso del crecimiento y la defoliación, debido al bloqueo del xilema impidiendo el movimiento del agua y nutrientes en la planta,

species worldwide, causing significant economic losses (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020; Summerell, 2019). Their invasion of plants'vascular tissue leads to symptoms such as root and stem discoloration, decay, wilting, growth inhibition, and defoliation. These effects result from the blockage of xylem, impeding the movement of water and nutrients within the plant and ultimately leading to its death (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020).

The primary challenge in controlling these pathogens lies in their capability to reside within host organisms and form structures that enable them to remain dormant in the soil in the absence of hosts (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Panth *et al.*, 2020).

An alternative approach for pest and disease control involves the utilization of RNA interference (RNAi), a natural mechanism in plants. Plants employ RNAi, which originates from viral infections, to generate specific resistance as a defense against viral attacks (Baulcombe, 2004). RNAi is generated through a process known as post-transcriptional gene silencing. This mechanism involves the recognition of double-stranded RNA (dsRNA) intermediates from the virus replication stage, which are cleaved into short RNAs of 21-26 nucleotides by an RNase III-like enzyme called Dicer. These small RNAs are incorporated into a RNA-induced silencing complex (RISC), containing an Argonaute (AGO) protein with endonucleolytic activity for cleaving the target RNA (Baulcombe, 2004; Van Kammen, 1997; Zhu *et al.*, 2019). The tool known as virus-induced gene silencing (VIGS) was developed based on this natural mechanism. VIGS employs viral vectors designed to carry the fragment of the gene of interest for silencing, enabling the analysis of gene functions in plants (Baulcombe, 1999; Bekele *et al.*, 2019). Additionally, it aids in pathogen control

hasta provocar su muerte (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020). Además, el control de estos patógenos se ha dificultado principalmente por su capacidad de habitar en el interior de sus hospederos y por producir estructuras que les permiten permanecer en estado de latencia en el suelo cuando los hospederos están ausentes (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Panth *et al.*, 2020).

Un enfoque alternativo para el control de plagas y enfermedades es el empleo de ARN de interferencia (ARNi), un mecanismo natural de las plantas, que emplean los ARNi producidos a partir de una infección por virus para generar una resistencia específica como defensa contra ese ataque viral (Baulcombe, 2004). Los ARNi se producen a través de un proceso conocido como silenciamiento génico post-transcripcional. Este mecanismo involucra el reconocimiento de intermediarios de ARN de doble cadena (ARNds) de la etapa de replicación de los virus, que son cortados en ARNs cortos de 21-26 nucleótidos por una enzima tipo RNasa III llamada Dicer. Estos ARN pequeños se incorporan a un complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), que contiene una proteína tipo Argonauta (AGO), con actividad endonucleolítica para el corte del ARN objetivo (Baulcombe, 2004; Van Kammen, 1997; Zhu *et al.*, 2019). Basados en este mecanismo natural, se desarrolló la herramienta denominada silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés), que emplea vectores virales diseñados para transportar el fragmento del gen de interés que se quiere silenciar, lo cual permite el análisis de la función de genes en plantas (Baulcombe, 1999; Bekele *et al.*, 2019) y el control de patógenos, al replicarse de manera sistémica junto con el genoma viral (Lange *et al.*, 2013; Becker and Lange, 2010). El silenciamiento génico ha demostrado eficacia para reducir los síntomas producidos por diferentes especies de *Fusarium* en plantas de

by systemic replication alongside the viral genome (Lange *et al.*, 2013; Becker and Lange, 2010). Gene silencing has demonstrated effectiveness in reducing symptoms caused by different *Fusarium* species in *Arabidopsis thaliana* plants, through the silencing of the lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase gene (Koch *et al.*, 2013). It has also been employed in banana (*Musa* spp.) by targeting genes related to conidial development and the production of velvet and FTF toxins (Ghag *et al.*, 2014), in wheat (*Triticum aestivum*) by silencing the *CHS3* gene of the chitin synthase family (Cheng *et al.*, 2015), and in barley (*Hordeum vulgare*) through silencing *AGO* and *DICER* genes essential for the silencing mechanism (Werner *et al.*, 2020).

Other potential target genes for the control of plant pathogenic fungi by gene silencing include chitin synthases (CHS), which are enzymes involved in the biosynthesis of chitin, an important structural component of the fungal cell wall (Roncero *et al.*, 2003; Lenardon *et al.*, 2010). Chitin and CHS are absent in plants and mammals, so this gene family has been considered a safe and attractive target for antifungal development (Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2015). Plant pathogenic fungi have multiple *CHS* genes and all of them have different roles in development and virulence (Lenardon *et al.*, 2012; Geoghegan *et al.*, 2017). It has been reported that mutation of *chitin synthase V* can cause alterations such as decreased infective capacity of *Fusarium oxysporum* in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants (Madrid *et al.*, 2003), but silencing of this same gene in *Fusarium culmorum* is not associated with reduced symptoms in maize plants (Chen *et al.*, 2016). Likewise, in some *Fusarium* species, the evaluation of *CHS4* has not been possible by generating mutants, but *in silico* evaluation has reported the possible existence of one or more *CHS4* genes that have been related to a high identity

*Arabidopsis thaliana*, mediante el silenciamiento del gen *lanosterol C14 $\alpha$ -desmetilasa* (Koch *et al.*, 2013); en banano (*Musa* spp.), con el silenciamiento de los genes relacionados con el desarrollo de los conidios y en la producción de toxinas *velvet* y *ftf* (Ghag *et al.*, 2014), en trigo (*Triticum aestivum*), silenciando el gen *CHS3* de la familia de las quitina sintasas (Cheng *et al.*, 2015); en plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) mediante el silenciamiento de los genes *AGO* y *DICER* requeridos para el mecanismo de silenciamiento (Werner *et al.*, 2020).

Otros posibles genes blancos para el control de hongos fitopatógenos mediante el silenciamiento génico son las quitinas sintasas (CHS), que son enzimas involucradas en la biosíntesis de quitina, un componente estructural importante de la pared celular fúngica (Roncero *et al.*, 2003; Lenardon *et al.*, 2010). La quitina y las CHS se encuentran ausentes en plantas y mamíferos, por lo que esta familia de genes ha sido considerada como un objetivo seguro y atractivo para el desarrollo de antifúngicos (Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2015). Los hongos fitopatógenos tienen múltiples genes de CHS y todos ellos presentan diferentes funciones en el desarrollo y en la virulencia (Lenardon *et al.*, 2012; Geoghegan *et al.*, 2017). Se ha reportado que la mutación de la quitina sintasa V puede provocar alteraciones como la disminución de la capacidad infectiva de *Fusarium oxysporum* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Madrid *et al.*, 2003), pero el silenciamiento de este mismo gen en *Fusarium culmorum* no está asociado con la reducción de los síntomas en plantas de maíz (Chen *et al.*, 2016). Así mismo, en algunas especies de *Fusarium*, la evaluación de la *CHS4* no ha sido posible mediante la generación de mutantes, pero la evaluación *in silico* ha reportado la posible existencia de uno o más genes de *CHS4* que se ha relacionado con una alta identidad con el gen *CHS7*; sin embargo, análisis de la actividad

with the *CHS7* gene; however, analysis of *CHS4* activity in *Saccharomyces cerevisiae* showed that they do not present the same cellular localization nor the same function in development (Larson *et al.*, 2011; Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Roncero *et al.*, 2003). However, in *Penicillium chrysogenum* it was observed that mutation of this gene reduces conidia formation and presents atrophied hyphae, causing changes in penicillin production (Liu *et al.*, 2013). These reports demonstrate that the function and characteristics of each chitin synthase differ depending on the fungal species and this also varies according to the interactions that the pathogen has with the host plant and its environment.

Gene silencing across organisms from different biological kingdoms is achievable through bidirectional molecule exchange. This exchange occurs, for instance, between pathogens and host plants (Wang *et al.*, 2016) and through cell-cell molecule movement. This inter-kingdom communication also involves transport mechanisms such as vesicles or receptor proteins (Majumdar *et al.*, 2017; Weiberg *et al.*, 2015). Moreover, certain fungal pathogens like *Botrytis cinerea* have the capacity to produce RNA interference (RNAi), enabling them to impede plant defense genes (Wang *et al.*, 2017). Conversely, plant microRNA production initiates fungal gene silencing. For instance, in cotton (*Gossypium hirsutum*) plants expressing *miR166* and *miR159*, specific genes of *Verticillium dahliae* are silenced, resulting in pathogen resistance (Zhang *et al.*, 2016). While this approach is effective, it necessitates the use of genetically modified organisms (GMOs) (Cai *et al.*, 2019).

An alternative strategy involves RNAi production in plants and subsequent transport to fungi via plant-replicating viral vectors, known as virus-induced gene silencing (VIGS). The systemic movement of RNAi from plants to fungi highlights

de *CHS4* en *Saccharomyces cerevisiae*, demostró que no presentan la misma localización celular ni la misma función en el desarrollo (Larson *et al.*, 2011; Martín-Udíroz *et al.*, 2004, Roncero *et al.*, 2003). Sin embargo, en *Penicillium chrysogenum* se observó que la mutación de este gen reduce la formación de conidios y presenta hifas atrofiadas, provocando cambios en la producción de penicilina (Liu *et al.*, 2013). Estos reportes demuestran que la función y características de cada quitina sintasa es diferente dependiendo de la especie de hongo y esto también varía de acuerdo con las interacciones que tenga el patógeno con la planta hospedera y su ambiente.

El silenciamiento génico entre organismos de diferentes reinos biológicos es posible mediante el intercambio bidireccional de moléculas, por ejemplo, entre el patógeno y la planta hospedera (Wang *et al.*, 2016), a través del movimiento de moléculas de célula-célula, así como también se han observado diferentes mecanismos asociados al movimiento como el transporte mediante vesículas o proteínas receptoras (Majumdar *et al.*, 2017; Weiberg *et al.*, 2015). Además, se han reportado a patógenos fúngicos como *Botrytis cinerea* que producen ARNi para inhibir genes de la defensa de las plantas (Wang *et al.*, 2017), pero también se ha inducido la producción de microARN fúngicos en las plantas para controlar a los patógenos, por ejemplo, se ha observado que plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*) transformadas para expresar *miR166* y *miR159* logran el silenciamiento específico de genes de *Verticillium dahliae* y de esta manera se genera resistencia contra este patógeno (Zhang *et al.*, 2016). Aunque es un método eficaz, implica la generación de organismos genéticamente modificados (OGM) (Cai *et al.*, 2019).

Una alternativa para la generación de resistencia en las plantas, sin la necesidad de generar cultivos transgénicos, es la producción y transporte

the biotechnological potential of RNAi silencing models (Cai *et al.*, 2018). This study aims to assess a VIGS vector carrying a fragment of the *Fusarium* sp. *CHS4* gene for its effectiveness in controlling fungal infection in *Nicotiana benthamiana*.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** Seeds of *Nicotiana benthamiana* were germinated in 120 mL unisel containers with Sunshine #3 special fine mix, which contains short fiber peatmoss, dolomitic lime and vermiculite, at  $25\pm 2$  °C, with a photoperiod of 16/8 hours light/dark and weekly fertilization with 4 mL L<sup>-1</sup> of Bayfolan® Forte (Bayer de México, S.A. de C.V. CropScience Division).

**Fungal material.** The fungus *Fusarium* sp. strain INECOL\_BM-06, provided by the Institute of Ecology A.C. (INECOL), was used. This strain was isolated from the ambrosial insect *Xylosandrus morigerus* in the Jaguaroundi ecological park in Coatzacoalcos, Veracruz (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2022). The strain was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) plates (BD, Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA), with subcultures every 30 days at room temperature, and was also preserved in 20% glycerol at -80 °C for 6 to 24 months.

**Cloning of the *chitin synthase 4* gene fragment of *Fusarium* sp.** The fungal *CHS4* gene fragment was amplified from DNA using the oligonucleotides CHS4F (5'-CAAATTATCCTCCTCATGTCGTTC-3') and CHS4R (5'-TCAGGATCTTTCACCATGGC-3'). These oligonucleotides amplify a 204 bp region encompassing the distinctive domain of chitin synthase 4 found in filamentous fungi. The design of

de ARNi de plantas a hongos empleando vectores virales que se pueden replicar en plantas (VIGS). Debido al movimiento sistémico de moléculas de ARNi de las plantas hacia los hongos, los modelos de silenciamiento por ARNi presentan una ventaja biotecnológica para su aplicación (Cai *et al.*, 2018). El objetivo de este trabajo fue evaluar la funcionalidad y la eficiencia de un vector VIGS que contenga un fragmento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. para controlar el proceso de infección de este hongo en *Nicotiana benthamiana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Se emplearon semillas de *Nicotiana benthamiana*, las cuales fueron germinadas en recipientes de unisel de 120 mL con mezcla fina especial Sunshine #3, el cual contiene peatmoss de fibra corta, cal dolomítica y vermiculita, a  $25\pm 2$  °C, con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y fertilización semanal con 4 mL L<sup>-1</sup> de Bayfolan® Forte (Bayer de México, S.A. de C.V. División CropScience).

**Material fúngico.** Se empleó el hongo *Fusarium* sp. cepa Inecol\_BM-06, proporcionada por el Instituto de Ecología A. C (INECOL), el cual fue aislada del insecto ambrosial *Xylosandrus morigerus* en el parque ecológico Jaguaroundi, en Coatzacoalcos, Veracruz (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2022). La cepa se mantuvo en cajas de medio PDA (Potato Dextrose Agar, BD, Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA), con resiembra cada 30 días a temperatura ambiente y también se conservó en glicerol al 20% a -80 °C de 6 a 24 meses.

**Clonación del fragmento del gen de quitina sintasa 4 de *Fusarium* sp.** El fragmento del gen *CHS4* del hongo se amplificó a partir de ADN, usando

these oligonucleotides was based on the sequences from *Fusarium graminearum* (XM\_011318750.1), *F. oxysporum* (XM\_018376225.1), and *F. verticillioides* (XM\_018888350.1), using the Primer designing tool provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

To ensure standardization, a series of tests were conducted, including gradient temperature alignment, annealing concentration, and oligonucleotide concentration assessments. The optimal conditions for the polymerase chain reaction (PCR) were as follows: initial denaturation at 95 °C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s, annealing at 58 °C for 30 s, extension at 72 °C for 20 s, and a final extension step at 72 °C for 5 min. The resulting PCR product was then inserted into the pGEM-T Easy cloning vector (Promega®, Madison, WI, USA), in accordance with the manufacturer's guidelines. Subsequently, the ligation products were employed to transform *Escherichia coli* TOP10 competent cells.

**Construction of the VIGS EuMV-YPΔCHS4 Vector.** For the development of the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, we employed the VIGS vector pEuMV-YP:ΔAV1, which was designed based on the A genomic component of the bipartite geminivirus *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula (EuMV-YP; DQ318937) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). The 204 bp segment of the *CHS4* gene, previously integrated into the pGEM:GCHS4 vector, was isolated using *SphI* and *PstI* restriction enzymes. Subsequently, it was fused with the VIGS pEuMV-YP:ΔAV1 vector, which had been previously treated with the same restriction enzymes. The resultant construct underwent sequencing by Macrogen Inc (Seoul, South Korea). Sequence analysis was performed using the NCBI BLASTn platform. The sequences were edited utilizing the Mega 6 (Tamura *et al.*,

los oligos CHS4F, 5'-CAAATTATCCTCATGTCGTTTC-3' y CHS4R 5'-TCAGGATCTTTCACCATGGC-3'. Los oligos amplifican una región de 204 pb, que comprende el dominio característico de la quitina sintasa 4 de hongos filamentosos, diseñados a partir de las secuencias de *Fusarium graminearum* (XM\_011318750.1), *F. oxysporum* (XM\_018376225.1) y *F. verticillioides* (XM\_018888350.1), empleando la herramienta "Primer designing tool" del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés).

Para la estandarización se realizaron pruebas de gradiente de temperatura de alineamiento, de concentración de templado y de concentración de oligos. Las condiciones de PCR óptimas fueron las siguientes: 1 ciclo a 95 °C por 1 min, 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 20 s y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto de PCR fue ligado en el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega®, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente los productos de la ligación se utilizaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* TOP10.

**Construcción del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4.** Para la construcción del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 se empleó el vector VIGS pEuMV-YP:ΔAV1, diseñado a partir del hemidímero A del geminivirus bipartita *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán península (EuMV-YP; DQ318937) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Se liberó el fragmento de 204 pb del gen *CHS4* clonado en el vector pGEM:GCHS4 con las enzimas de restricción *SphI* y *PstI* y se ligó al VIGS pEuMV-YP:ΔAV1 que previamente había sido digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción obtenida fue enviada a secuenciar a la compañía Macrogen Inc (Seúl, Corea del Sur). El análisis de la secuencia

2013) and Biedit (Hall, 1999) software to eliminate vector-specific elements.

**Inoculation of *N. benthamiana* plants with *Fusarium* sp.** A fungal culture grown for 15-30 days in Potato Dextrose Broth (PDB) liquid medium (BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) was utilized. The mycelium was gathered and homogenized in a blender at maximum speed for 1 minute. The concentration of the mycelial fragments was adjusted to  $10^6$  mL<sup>-1</sup> and combined with grenetin to reach a final concentration of 1% (v/v). This mixture of mycelial fragments was applied to a previously created scalpel cut of approximately 0.5 mm on the stem, positioned between the root and the first petiole of each plant. Uninoculated control plants (SI) harboring *Fusarium* sp. were inoculated with 1% (v/v) grenetin at the incision point. The plants were then maintained under the photoperiod conditions outlined earlier, either for 14 days or until plant mortality occurred.

**Silencing induced by the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector in the context of *Fusarium* sp. and *N. benthamiana* interaction.** To assess the influence of VIGS vector treatments during the infection process, symptoms of leaf drop and stem necrosis were monitored in *N. benthamiana* plants. Two groups were examined, each comprising six 3-week-old plants per treatment and collection day: the initial group of *N. benthamiana* plants was exposed to fungal inoculation five days prior to being subjected to bombardment with gold microprojectiles coated with VIGS vector DNA (as detailed later). Stem samples were obtained at 7 and 14 days post bombardment (dpB), corresponding to 12 and 19 days post inoculation (dpI) with *Fusarium* sp. These plants were labeled as E-CHS4 (7 dpB/12 dpI and 14 dpB/19 dpI, respectively). In the second group of *N. benthamiana* plants, bombardment with

se realizó en la plataforma BLASTn del NCBI. Las secuencias fueron editadas con los programas Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) y Biedit (Hall, 1999) para eliminar la secuencia correspondiente al vector.

**Inoculación de plantas de *N. benthamiana* con *Fusarium* sp.** Se empleó un cultivo del hongo de 15-30 días de crecimiento en medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth, BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA), se colectó el micelio y se homogenizó en una licuadora durante 1 minuto a máxima velocidad. La concentración de fragmentos se ajustó a  $10^6$  fragmentos de micelio mL<sup>-1</sup> y se mezcló con grenetina a una concentración final de 1% (v/v). La mezcla de fragmentos de micelio se aplicó sobre un corte de bisturí de aproximadamente 0.5 mm realizado previamente en el tallo, en el área entre la raíz y el primer peciolo de cada planta. A las plantas control sin inocular (SI) con *Fusarium* sp. se les colocó grenetina al 1% (v/v) en el punto de corte. Las plantas se mantuvieron en las condiciones de fotoperiodo descritas previamente, durante 14 días o hasta la muerte de la planta.

**Silenciamiento promovido por el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 durante la interacción de *Fusarium* sp.-*N. benthamiana*.** Para analizar el efecto de los tratamientos con el vector VIGS durante el proceso de infección, se observaron los síntomas de caída de hojas y el necrosamiento del tallo en plantas de *N. benthamiana*. Para ello se evaluaron dos grupos, en cada grupo se emplearon seis plantas de tres semanas de edad por tratamiento y por día de colecta: el primer grupo de plantas de *N. benthamiana* fueron inoculadas con el hongo cinco días antes de ser bombardeadas con microprojectiles de oro recubiertos con el ADN del vector VIGS (procedimiento descrito posteriormente) y se tomaron muestras de tallo a los 7 y 14 días posteriores

the VIGS vector preceded fungal inoculation by 5 days, adhering to the previously detailed conditions. Stem samples were collected at 7 and 14 dpI. These plants were designated as O-CHS4 (7 dpI/12 dpB and 14 dpI/19 dpB). All experiments were conducted in triplicate with 6 plants per replicate, yielding a total of 18 plants per treatment/collection day over the study period. For both examined plant groups, bombardment was performed using 1 µm gold microprojectiles (BioRad, Hercules, California, USA) coated with 10 µg of DNA for each viral component. In particular, 5 µg of the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4 and 5 µg of the wild-type EuMV-YP component B were used for component A. Bombardment was conducted from a 2 cm distance from the plant, employing 30 PSI of helium gas. Control groups consisted of SI plants and plants solely inoculated with *Fusarium* sp (I). The number of lost leaves and the extent of damage caused by the fungus during the initial week were documented.

**Quantitative PCR (qPCR) analysis of the relative expression of the *CHS4* gene during the *Fusarium* sp. -*N. benthamiana* interaction.** To assess the relative expression of the *CHS4* gene, RNA extraction from collected stems was realized using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the provided guidelines. Subsequently, for cDNA synthesis, 100-500 ng of total RNA and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were employed. In brief, 200 ng of oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was incubated for 5 minutes at 65 °C, followed by 1 minute on ice. Then, 4 µL of first-strand buffer, 1 µL of 0.1M DTT, and 1 µL of RNaseOUT™ were added and incubated at 25 °C for 5 minutes, followed by 50 °C for 60 minutes; finally, the reaction was deactivated by incubation at 70 °C for 15 minutes (modified from Gerard *et*

al bombardeo (dpB) correspondiente a 12 y 19 días posterior a la inoculación (dpI) con *Fusarium* sp. Estas plantas se nombraron como E-CHS4 (7 dpB/12 dpI y 14 dpB/19 dpI, respectivamente). El segundo grupo de plantas de *N. benthamiana*, fueron bombardeadas primero con el vector VIGS y cinco días después del bombardeo fueron inoculadas con el hongo, con las condiciones descritas anteriormente. Se colectaron muestras de tallo a los 7 y 14 dpI. Estas plantas se nombraron como O-CHS4 (7 dpI/ 12 dpB y 14 dpI/ 19 dpB). Todos los experimentos se realizaron con 3 réplicas con 6 plantas por réplica, teniendo un total de 18 plantas por tratamiento/día de colecta en el curso temporal. Para ambos grupos de plantas evaluadas, se bombardearon con microproyectiles de oro de 1 µm (BioRad, Hercules, California, USA) cubiertos con 10 µg de ADN de cada componente viral; para el componente A se emplearon 5 µg del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 y 5 µg del componente B de EuMV-YP del virus silvestre. El bombardeo se realizó a 2 cm de distancia de la planta y con 30 PSI de gas helio. Los controles empleados fueron plantas SI y plantas únicamente inoculadas con *Fusarium* sp (I). Se contabilizó el número de hojas perdidas y la longitud del daño causado por el hongo durante la primera semana.

**Análisis por PCR cuantitativo (qPCR) de la expresión relativa del gen *CHS4* durante la interacción *Fusarium* sp. -*N. benthamiana*.** Para evaluar la expresión relativa del gen *CHS4*, se realizó previamente la extracción del ARN de los tallos colectados, utilizando TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, para la síntesis de ADNc se emplearon 100-500 ng de ARN total y la SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, se emplearon 200 ng de oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA,



*al.*, 1997). Subsequently, 10-20 ng of cDNA was utilized for qPCR reactions. These reactions were conducted using the Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, NY, USA) with a 48-well setup, along with SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The qPCR conditions were as follows: one cycle of 50 °C for 2 minutes and 95 °C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 seconds, 58 °C for 1 minute, and 72 °C for 30 seconds. The oligos used were CHS4F, 5'-CAAATTATCCTCATGTCGTTC-3', and CHS4R 5'-TCAGGATCTTTCACCATGGC-3' as previously mentioned. The results were normalized to the actin gene of *Fusarium solani* (XM\_046282608.1). The treatments used to assess expression were as follows: (1) Uninoculated plants, (2) Plants inoculated with the fungus, (3) Plants inoculated with the vector, (4) E-CHS4 plants 7dpB/12dpI, (5) E-CHS14 plants 14dpB/19dpI, (6) O-CHS4 plants 7dpI/12dpB, and (7) Plants 14dpI/19dpB. Amplifications were performed in quadruplicate, and relative expression levels were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

**Statistical analysis.** The data acquired concerning leaf loss and lesion size were subjected to ANOVA, followed by the Tukey *post hoc* test, using a significance level of  $p=0.05$ , through the employment of RStudio Team (2022) software. Before the ANOVA test, the normality of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was verified through the Levene test.

## RESULTS

**Analysis of the cloned CHS4 gene fragment.** The obtained results indicated that the cloned

USA), se incubó por 5 min a 65 °C y luego en hielo por 1 min, se agregaron 4 µL de first-strand buffer, 1 µL de 0.1M DTT, 1 µL de RNaseOUT™, se incubó a 25 °C por 5 min, posteriormente a 50 °C por 60 min, finalmente se inactivó la reacción incubando a 70 °C por 15 min (modificado de Gerard *et al.*, 1997). Luego se emplearon de 10-20 ng de ADNc para las reacciones de qPCR. Las reacciones se realizaron en el equipo de Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, NY, USA) de 48 pozos y usando SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de qPCR fueron las siguientes: un ciclo de 50 °C por 2 min y 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30s, 58 °C por 1min y 72 °C por 30 s. Los oligos utilizados fueron CHS4F, 5'-CAAATTATCCTCATGTCGTTC-3' y CHS4R 5'-TCAGGATCTTTCACCATGGC-3' mencionados anteriormente. Los resultados fueron normalizados con el gen de actina de *Fusarium solani* (XM\_046282608.1). Los tratamientos empleados para evaluar la expresión fueron los siguientes: (1) Plantas sin inocular (2) Plantas inoculadas con el hongo, (3) Plantas inoculadas con el vector, (4) Plantas E-CHS4 7dpB/12dpI, (5) Plantas E-CHS14 dpB/19dpI, (6) Plantas O-CHS4 7dpI/12dpB y (7) Plantas 14dpI/19dpB. Las ampli-ficaciones se realizaron por cuadruplicado y los niveles de expresión relativa se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos de la pérdida de hojas y el tamaño de la lesión fueron analizados mediante la prueba de ANOVA y Tukey *post hoc* test con un nivel de significancia de  $p=0.05$  usando el software RStudio Team (2022). Antes de la prueba de ANOVA, se usaron la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para la homogeneidad de las varianzas.

gene fragment exhibited a 95% identity with the *chitin synthase 4* gene of *Fusarium vanettenii* (XM\_003053353.1), a 95% identity with the *CHS4* gene of *F. facilforme* (CP104050.1), and a 94% identity with the *CHS4* gene of a *F. solani* strain (CP090036.1). Upon translating the 204-nucleotide fragment into a protein, a sequence of 68 amino acid residues was discerned (Figure 1), within which the DADT domain was identified. This domain is among those characterizing the chitin synthase family 4, which is the most prevalent among filamentous fungi (Pacheco-Arjona and Ramirez-Prado, 2014).

## RESULTADOS

**Análisis del fragmento de *CHS4* clonado.** Los resultados obtenidos mostraron que el fragmento del gen clonado presentó un 95% de identidad con el gen de la quitina sintasa 4 de *Fusarium vanettenii* (XM\_003053353.1), 95% de identidad con el gen *CHS4* de *F. facilforme* (CP104050.1) y 94% de identidad con el gen *CHS4* de una cepa de *F. solani* (CP090036.1). Al traducir a proteína el fragmento obtenido de 204 nucleótidos, se observó una secuencia de aminoácidos de 68 residuos (Figura 1), en el que se identificó el dominio DADT, que

```

1  CAGATCATCCTCATGTCTTTCCTTCAAAGGTCATGTTTGATGAGCGAATGACGGAACTCGAGTAC 66
   Q I I L M S F L Q K V M F D E R M T E L E Y
67  GAAATGTTCAACGGCCTCTGGAAGGTGACTGGTATCTCGCCGGACTACTATGAGATTATTCTGATG 132
   E M F N G L W K V T G I S P D Y Y E I I L M
133 GTAGACGCCGATACAAAGGTGTTCCCTGACAGTCTGACGCACATGATCTCTGCTATGGTCAAAGAT 198
   V D A D T K V F P D S L T H M I S A M V K D
199 CCTGAA 204
   P E
    
```

Figure 1. Amino acid and nucleotide sequence of the partial *CHS4* fragment from *Fusarium* sp. The inset shows the DADT domain, which characterizes family 4 of fungal chitin synthases.

Figura 1. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos del fragmento parcial de *CHS4* de *Fusarium* sp. En el recuadro se muestra el dominio DADT, que caracteriza a la familia 4 de las quitinas sintasas de hongo.

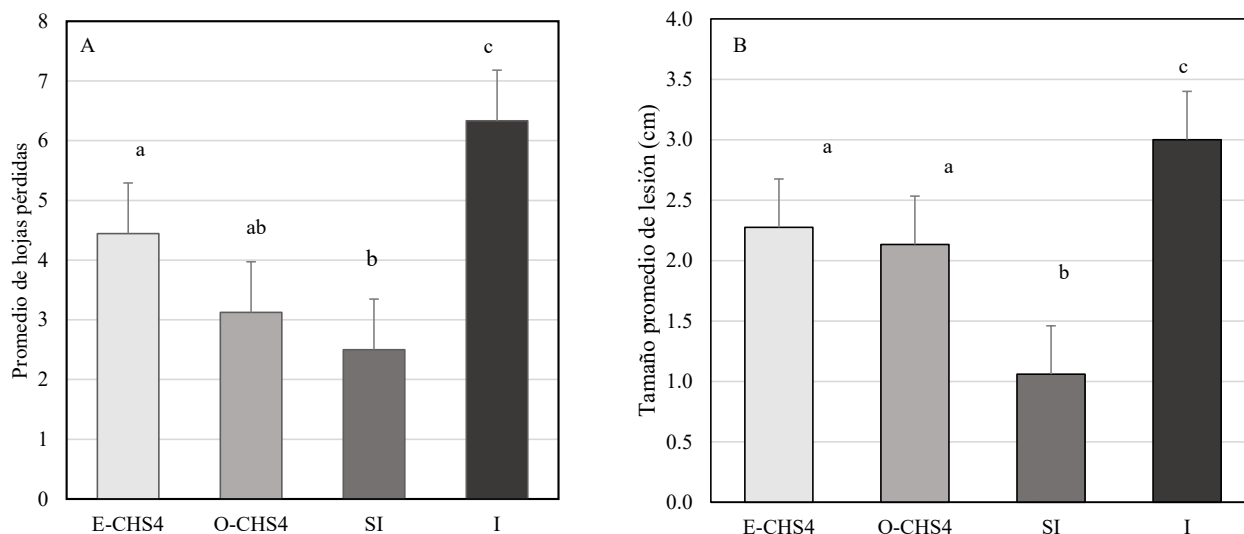
**Evaluation of the symptomatology of *Fusarium* sp. inoculation in *N. benthamiana*.** A comparison was made between the symptoms observed in the two groups of plants. The results revealed that within the E-CHS4 treatment, the average leaf loss amounted to 4 per plant during the initial week of *Fusarium* sp. infection, whereas for the O-CHS4 treatment, the average leaf loss per plant was 3. In the case of healthy SI plants, the average count of shed leaves was 2, a natural occurrence stemming from mechanical damage inflicted on the plants. Among the infection control plants (I), the average leaf loss reached 6. In the course

es uno de los dominios que caracteriza a la familia 4 de las quitinas sintasas, la más distribuida en hongos filamentosos (Pacheco-Arjona y Ramirez-Prado, 2014).

**Evaluación de la sintomatología de la inoculación de *Fusarium* en *N. benthamiana*.** Se compararon los síntomas observados en los dos grupos de plantas. Los resultados mostraron que en el tratamiento E-CHS4 la pérdida promedio de hojas fue de 4 por planta durante la primera semana de la infección con *Fusarium* sp., mientras que para el tratamiento O-CHS4, la pérdida promedio de hojas

of the statistical analysis, a noteworthy disparity in leaf drop emerged between the E-CHS4, O-CHS4, and SI treatments compared to the I treatment. Nevertheless, no significant difference materialized between the E-CHS4 and O-CHS4 treatments, and similarly, no significant difference was evident between the O-CHS4 treatment and the SI control. However, a marked variance was discerned between the E-CHS4 treatment and the SI control (Figure 2A). Another variable subjected to analysis for gauging the efficacy of VIGS treatments was the size of lesions arising from the fungus on plant stems. The average lesion size on *N. benthamiana* stems with E-CHS4 and O-CHS4 treatments measured 2 cm, whereas plants subject to the I treatment displayed lesions averaging 3 cm. SI control plants exhibited an average lesion

fue de 3 por planta. En las plantas sanas SI, el promedio de hojas perdidas fue de 2, esta caída natural fue consecuencia del daño mecánico realizado a la planta. Las plantas control de la infección con el hongo (I) el promedio de pérdida de hojas fue de 6. En el análisis estadístico se observó diferencia significativa en la caída de hojas entre los tratamientos E-CHS4, O-CHS4 y SI con el tratamiento I, pero no se observó diferencia significativa entre los tratamientos E-CHS4 y O-CHS4, así como tampoco se obtuvo diferencia significativa entre el tratamiento O-CHS4 con el control SI, pero si se observó diferencia significativa entre el tratamiento E-CHS4 con el control SI (Figura 2A). Otra variable analizada para establecer la eficiencia de los tratamientos con VIGS fue el tamaño de la lesión causada por el hongo en el tallo de las plantas. El tamaño



**Figure 2.** Number of leaves lost and average lesion size in cm, during E-CHS4 and O-CHS4 treatment with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4. A. Average number of leaves lost in *N. benthamiana* plants with E-CHS4 and O-CHS4 treatment, healthy control plants (SI) and plants inoculated with *Fusarium* sp. (I). B. Average lesion size in cm in plants with treatment E-CHS4, O-CHS4, SI and I. Letters above the bar indicate significant differences, with a Tukey's analysis test with a  $p < 0.05$ .

**Figura 2.** Número de hojas perdidas y tamaño promedio de lesión en cm, durante tratamiento E-CHS4 y O-CHS4 con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. A. Número promedio de hojas perdidas en plantas de *N. benthamiana* con el tratamiento E-CHS4 y O-CHS4, plantas control sana (SI) y plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (I). B. Tamaño promedio de lesión en cm en plantas con el tratamiento E-CHS4, O-CHS4, SI e I. Las letras arriba de la barra indican las diferencias significativas, con una prueba de análisis de Tukey's con una  $p < 0.05$ .

size of 1 cm due to scalpel-induced mechanical damage. Statistical evaluation indicated that the mean lesion size did not display a significant difference between the E-CHS4 and O-CHS4 treatments. However, both treatments showed a substantial disparity when compared to the I plants solely infected with *Fusarium* sp. (Figure 2B). Collectively, these findings imply that treatments involving the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector can mitigate the symptoms triggered by *Fusarium* sp. in *N. benthamiana*. During the course of the experiment, other symptoms caused by the fungus were analyzed, such as loss of turgor, increased wilting and reduced plant growth. In Figure 3A line 1, it was observed that after 7dpB/12dpI, the I plants showed symptoms such as loss of turgor in the upper leaves and wrinkling and wilting of the

promedio de las lesiones en los tallos de *N. benthamiana* con los tratamientos E-CHS4 y O-CHS4 fue de 2 cm, mientras que las plantas con el tratamiento I tuvieron lesiones con un promedio de 3 cm y en las plantas control SI presentaron un tamaño de lesión promedio de 1 cm, este debido al daño mecánico realizado con el bisturí. El análisis estadístico mostró que el promedio del tamaño de la lesión no tuvo diferencia significativa entre los tratamientos E-CHS4 y O-CHS4, pero ambos tratamientos mostraron una diferencia significativa con las plantas I, aquellas únicamente infectadas con *Fusarium* sp. (Figura 2B). Estos resultados sugieren que los tratamientos con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 pueden atenuar los síntomas causados por *Fusarium* sp. en *N. benthamia*. Durante el curso del experimento se analizaron otros síntomas causados

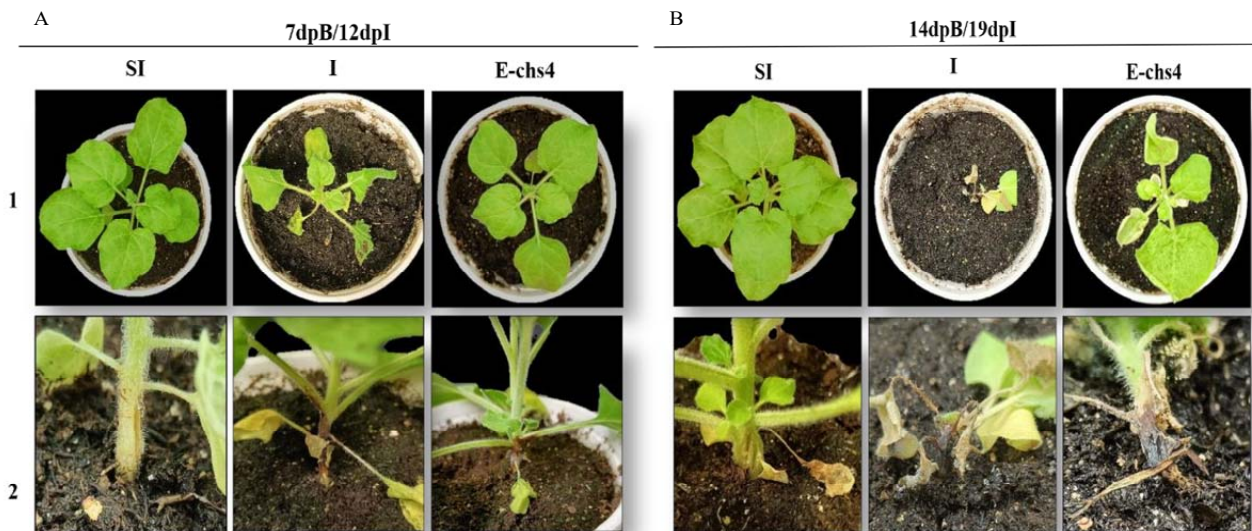


Figure 3. Symptom analysis in *N. benthamiana* plants inoculated with *Fusarium* sp. and subsequently inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4 (treatment E-CHS4). A. *N. benthamiana* plants at 7dpB/12dpI and B. *N. benthamiana* plants at 14dpB/19 dpI; SI: healthy control plants, I: plants inoculated with *Fusarium* sp. and E-CHS4: plants inoculated with *Fusarium* sp. and inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4. 1: Top view and 2: Side view of plants.

Figura 3. Análisis de síntomas en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con *Fusarium* sp. y posteriormente inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 (tratamiento E-CHS4). A. Plantas de *N. benthamiana* a los 7dpB/12dpI y B. Plantas de *N. benthamiana* a los 14dpB/19 dpI; SI: plantas control sana, I: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. y E-CHS4: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. e inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. 1: Vista superior y 2: Vista lateral de las plantas.

same, while the plants with the E-CHS4 treatment showed physiological characteristics similar to the SI control plants (Figure 3A, line 1); however, wrinkling was presented in the upper leaves and a decrease in growth was observed compared to the plants with the SI control treatment. Stem necrosis was also observed (Figure 3A line 2). The effect on symptom attenuation was not permanent, since at 14 dpB/19 dpI (Figure 3B), the plants with the E-CHS4 treatment showed symptoms of wilting and wrinkling of the upper leaves, loss of leaf turgor and stem necrosis (Figure 3B line 1), specifically the stem necrosis presented characteristics similar to those observed in the I plants (Figure 3B line 2). In the O-CHS4 treatment, it was observed that the plants at 7 dpI/12 dpB showed a lower level of symptoms compared to the I plants and showed characteristics similar to the SI control plants (Figure 4A line 1), only damage was observed at the base of the stem (Figure 4A line 2). The decrease

por el hongo como pérdida de turgencia, aumento del marchitamiento y la reducción del crecimiento de las plantas. En la Figura 3A línea 1, se observó que después de los 7dpB/12dpI, las plantas I presentaron síntomas como la pérdida de turgencia de las hojas superiores y el arrugamiento y marchitamiento de las mismas, mientras que las plantas con el tratamiento E-CHS4 mostraron características fisiológicas similares a las plantas control SI (Figura 3A, línea 1); sin embargo, se presentó arrugamiento en las hojas superiores y se observó una disminución del crecimiento en comparación con las plantas con el tratamiento control SI. También se observó el necrosamiento en el tallo (Figura 3A línea 2). El efecto en la atenuación de los síntomas no fue permanente, ya que a los 14 dpB/19 dpI (Figura 3B), las plantas con el tratamiento E-CHS4 mostraron síntomas de marchitamiento y arrugamiento de las hojas superiores, pérdida de turgencia de las hojas y necrosamiento del tallo (Figura

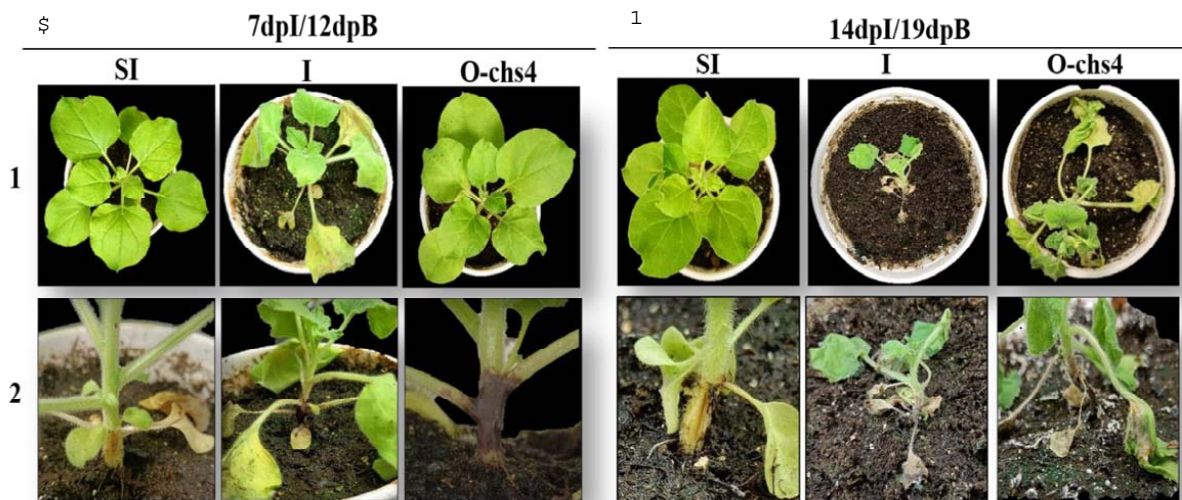


Figure 4. Symptom analysis in *N. benthamiana* plants inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4 and subsequently inoculated with *Fusarium* sp. (treatment O-CHS4). A. Plants at 7dpi/12dpB. B. Plants at 14 dpi and 19 dpB; SI: healthy control plants, I: plants inoculated with *Fusarium* sp and E-chs4: plants inoculated with *Fusarium* sp. and inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4. 1: Top view and 2: Side view of plants.

Figura 4. Análisis de síntomas en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 y posteriormente inoculadas con *Fusarium* sp. (tratamiento O-CHS4). A. Plantas a los 7dpi/12dpB. B. Plantas con 14 dpi y 19 dpB; SI: plantas control sana, I: plantas inoculadas con *Fusarium* sp y E-chs4: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. e inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. 1: Vista superior y 2: Vista lateral de las plantas.

in symptoms in this treatment was not a permanent effect, since at 14 dpI/19 dpB (Figure 4B line 1), the symptoms of wilting and loss of leaf turgor increased and were similar to that observed in the fungal infection control plants I. The damage to the base of the stem of the plants with the O-CHS4 treatment was similar to that observed in the I plants (Figure 4B line 2). These results showed that the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector is capable of delaying symptoms in the *Fusarium sp.-N. benthamiana* interaction during the establishment of infection, but this effect is transient.

**Relative expression of the *CHS4* gene of *Fusarium sp.* during its interaction with *N. benthamiana* plants.** In plants subjected to the E-CHS4 treatment, it was observed that the expression of the *CHS4* gene increased fourfold after 7 dpB compared to the I control. However, at 14 dpB using the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, the relative expression of the *CHS4* gene decreased by 20% in comparison to the infected control (Figure 5). For plants treated with the O-CHS4 regimen, a reduction in the relative expression of *CHS4* by 30% was noted after 7 dpI in comparison to infected control plants. Nevertheless, at 14 dpI, the relative expression of the *CHS4* gene increased 2.5 times relative to the infected control (Figure 6). These findings suggest that the observed effects on the symptoms of E-CHS4 and O-CHS4 plants may be linked to the transient silencing of the *CHS4* gene, stemming from the presence of the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector and its replication within *N. benthamiana* plants.

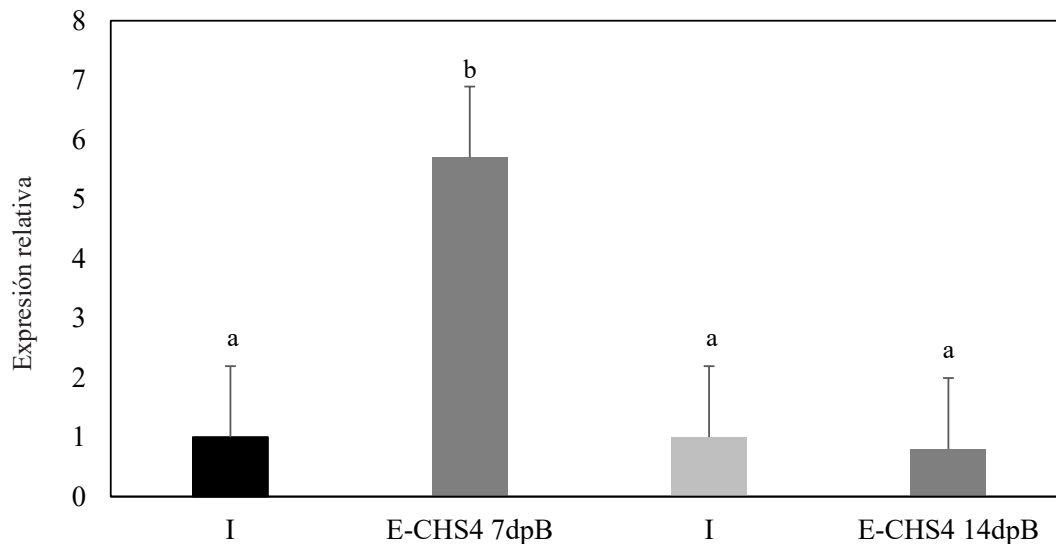
## DISCUSSION

In the plant-pathogen interaction, bidirectional exchange facilitates the establishment of pathogen

3B línea 1), específicamente el necrosamiento del tallo presentó características similares al observado en las plantas I (Figura 3B línea 2).

En el tratamiento O-CHS4, se observó que las plantas a los 7 dpI/12 dpB mostraron menor nivel de síntomas en comparación con las plantas I y mostraron características similares a las plantas control SI (Figura 4A línea 1), solo se observó el daño en la base del tallo (Figura 4A línea 2). La disminución de los síntomas en este tratamiento no fue un efecto permanente, ya que a los 14dpI/19dpB (Figura 4B línea 1), los síntomas de marchitamiento y pérdida de turgencia de las hojas aumentó y fue similar a lo observado en las plantas control de infección con el hongo I. El daño de la base del tallo de las plantas con el tratamiento O-CHS4 fue similar a lo observado en las plantas I (Figura 4B línea 2). Estos resultados mostraron que el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 es capaz de retrasar los síntomas en la interacción *Fusarium sp.-N. benthamiana*, durante el establecimiento de la infección, pero este efecto es transitorio.

**Expresión relativa del gen *CHS4* de *Fusarium sp.* durante su interacción con plantas de *N. benthamiana*.** En las plantas con el tratamiento E-CHS4 se observó que después de los 7 dpB la expresión del gen *CHS4* se incrementó cuatro veces más comparado con el control I, en cambio a los 14 dpB con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4, la expresión del gen *CHS4* disminuyó su expresión relativa un 20% con respecto al control infectado (Figura 5). En el caso de las plantas con el tratamiento O-CHS4 se observó una disminución en la expresión relativa de *CHS4* después de los 7 dpI, del 30% con respecto a las plantas control infectadas, sin embargo, a los 14 dpI la expresión relativa del gen *CHS4* aumentó 2.5 veces con respecto al control infectado (Figura 6). Estos resultados indican que el efecto observado en la sintomatología



**Figure 5.** Relative quantification by qPCR analysis of the *CHS4* gene fragment of *Fusarium* sp. in plant stems with the E-CHS4 treatment. The *Fusarium* actin gene was used to normalize the data. E-CHS4 7dpB: relative *CHS4* expression in *Fusarium* sp. inoculated plants at 7 days with E-CHS4 treatment; E-CHS4 14dpB: relative *CHS4* expression in *N. benthamiana* plants with *Fusarium* sp. at 14 days with E-CHS4 treatment. I: Inoculated control plants.

**Figura 5.** Cuantificación relativa mediante análisis qPCR del fragmento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. en tallos de plantas con el tratamiento E-CHS4. Se empleó el gen de la actina de *Fusarium* para normalizar los datos. E-CHS4 7dpB: Expresión relativa de *CHS4* en plantas inoculadas con *Fusarium* sp. a los siete días con el tratamiento E-CHS4; E-CHS4 14dpB: expresión relativa de *CHS4* en plantas de *N. benthamiana* con *Fusarium* sp. a los 14 días con el tratamiento E-CHS4. I: Plantas control inoculadas.

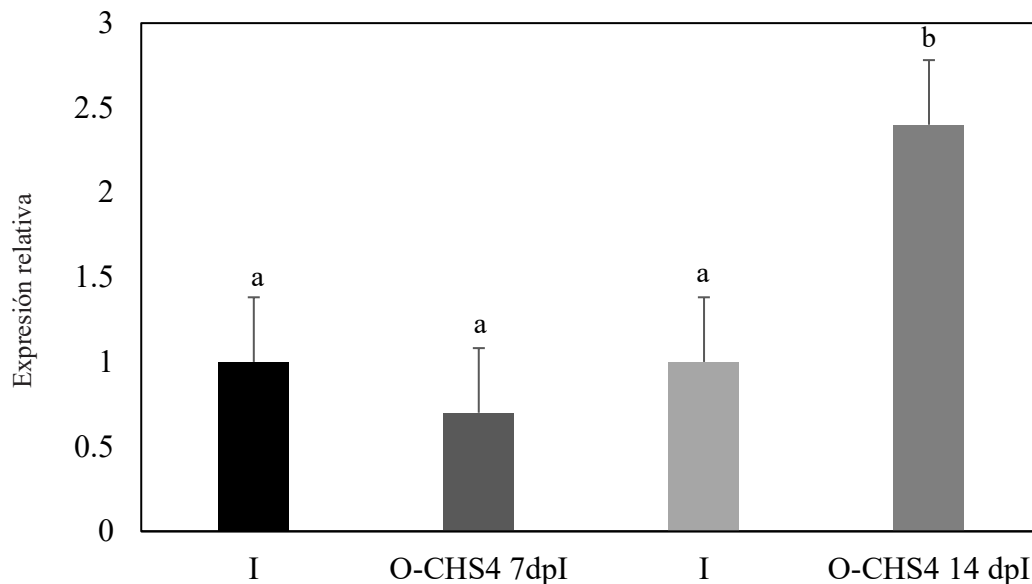
infection and activation of host defense mechanisms (Cai *et al.*, 2019). This study assessed the impact of employing a VIGS vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula (EuMV-YP) to induce silencing of the *CHS4* gene of *Fusarium* sp. during its interaction with *N. benthamiana*. The results obtained demonstrated a reduction in symptoms among plants infected with *Fusarium* sp. and subjected to bombardment with the VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* vector. Importantly, this effect was achieved without generating stable transgenic plants or relying on fungal mutants, which are conventional methods employed for the analysis of fungal genes.

VIGS systems initially evolved as tools for plant gene analysis. However, the evolution of

de las plantas E-CHS4 y O-CHS4 puede estar relacionado con el silenciamiento transitorio del gen *CHS4*, producto de la presencia del vector VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* y su replicación en las plantas de *N. benthamiana*.

## DISCUSIÓN

En la interacción planta-patógeno el intercambio bidireccional permite el establecimiento de una infección por parte del patógeno, así como la activación de la defensa del hospedero (Cai *et al.*, 2019). En este estudio, se evaluó el efecto de la aplicación de un vector VIGS basado en el *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán península (EuMV-YP),



**Figure 6.** Relative quantification by qPCR analysis of the *CHS4* gene fragment of *Fusarium* sp. in plant stems with the O-CHS4 treatment. The *Fusarium* actin gene was used to normalize the data. O-CHS4 7dpI: relative *CHS4* expression in *N. benthamiana* plants with EuMV-YPΔ*CHS4* VIGS vector treatment seven days post inoculation with *Fusarium* sp.; O-CHS4 14 dpI: relative *CHS4* expression in *N. benthamiana* plants with EuMV-YPΔ*CHS4* vector treatment 14 days post inoculation with *Fusarium* sp. I: inoculated control plants.

**Figura 6.** Cuantificación relativa mediante análisis qPCR del fragmento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. en tallos de plantas con el tratamiento O-CHS4. Se empleó el gen de la *actina* de *Fusarium* para normalizar los datos. O-CHS4 7dpI: Expresión relativa de *CHS4* en plantas de *N. benthamiana* con tratamiento con el vector VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* siete días posterior a la inoculación con *Fusarium* sp.; O-CHS4 14 dpI: expresión relativa de *CHS4* en plantas de *N. benthamiana* con tratamiento con el vector EuMV-YPΔ*CHS4* 14 días posteriores a la inoculación con *Fusarium* sp. I: plantas control inoculadas.

novel protocols and viral vectors has demonstrated their applicability in fungi. These systems offer a direct and facile strategy, effectively curtailing costs and labor time (Tinoco *et al.*, 2010; Mascia *et al.*, 2014). Application of the VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* vector yielded a reduction in the distinct symptoms induced by *Fusarium* sp. infection in *N. benthamiana* plants, including leaf drop and lesion size (Figure 2). Parallel outcomes were documented in studies leveraging HIGS (host-induced gene silencing) technology. For instance, in *A. thaliana*, plants expressing dsRNA against the lanosterol C-14 $\alpha$ -demethylase (*CYP5*) gene of *F. graminearum* remained symptom-free after

para inducir el silenciamiento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. durante la interacción con *N. benthamiana*. Los resultados obtenidos demostraron la disminución de síntomas en las plantas infectadas con *Fusarium* sp. y bombardeadas con el vector VIGS EuMV-YPΔ*CHS4*, sin la producción de plantas transgénicas estables o del uso de mutantes del hongo, que son los métodos empleados para el análisis de genes fúngicos.

Los sistemas VIGS son una herramienta desarrollada originalmente para el análisis génico en plantas, pero el desarrollo de nuevos protocolos y vectores virales han demostrado su utilidad para el análisis en hongos, como una estrategia directa



infection, unlike their non-transformed dsRNA-lacking counterparts. These plants displayed a mere 0.9% leaf area infected, in stark contrast to the 77% presented by untreated, infected controls, three days post-inoculation (Koch *et al.*, 2013). Conversely, wheat plants expressing dsRNA featuring a hairpin structure targeted at the chitin synthase 3 (*Chs3b*) gene of *F. graminearum* demonstrated subdued infection symptoms. Additionally, lesion length diminished from 8.5 mm to values ranging between 6.7 mm and 4.5 mm across all gene constructions evaluated (Cheng *et al.*, 2015). In the context of silencing technologies such as SIGS (Spray-induced gene silencing), Höfle *et al.* (2020) illustrated that applying dsRNA of varying lengths derived from the *CYP5* gene onto *A. thaliana* leaves resulted in up to an 82% reduction in *F. graminearum* infection symptoms, compared to controls. This outcome echoes our observations in this study utilizing VIGS. Here, the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector led to a decrease in lesion size from 3 cm, as seen in plants solely inoculated with *Fusarium* sp., to 2 cm. From these data, it is reasonable to infer that silencing mechanisms may elicit disparate responses and phenotypes, even when targeting genes with related functions or within the same fungal species.

While the HIGS technique has been introduced as a strategy for exploring fungal-plant interactions, it operates through the generation of transgenic plants capable of producing RNAi (Nowara *et al.*, 2010; Panwar *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015). This characteristic has limited its acceptance among consumers due to potential unknown environmental consequences (Cai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016). Consequently, the use of VIGS vectors emerges as an alternative mechanism to the HIGS system, forming part of the new generation of RNA-based fungicides (Padilla-Roji *et al.*, 2023).

The application of VIGS to silence the expression of fungal genes has been previously

y fácil de realizar, reduciendo costos y tiempo de trabajo (Tinoco *et al.*, 2010; Mascia *et al.*, 2014). La aplicación del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 disminuyó los síntomas característicos provocados por la infección con *Fusarium* sp. en plantas de *N. benthamiana*, como la caída de hojas y el tamaño de la lesión (Figura 2). Resultados similares se reportaron en trabajos en los que se aplica la tecnología HIGS (host inducing gene silencing), por ejemplo, en plantas de *A. thaliana* que expresaban un ARNs contra el gen de la citocromo P450 lanosterol C-14 $\alpha$ -demetilasa (*CYP5*) de *F. graminearum*, las plantas infectadas con el hongo no presentaron síntomas de infección en comparación con el control infectado sin transformar con el ARNs a los tres días después de la inoculación, además, mostraron un porcentaje de área foliar infectada de 0.9%, en contraste con el 77% que presentó el control infectado (Koch *et al.*, 2013). Por otro lado, en plantas de trigo que expresaban ARNs con estructura de horquilla para el gen de la quitina sintasa 3 (*Chs3b*) de *F. graminearum*, presentaron síntomas débiles de infección y una reducción en la longitud de la lesión de 8.5 mm a 6.7, 6.6, 5.7 y hasta 4.5 mm en todas las construcciones evaluadas para este gen (Cheng *et al.*, 2015). En el caso de tecnologías de silenciamiento como SIGS (Spray-induced gene silencing), Höfle *et al.* (2020), mostraron que la aplicación de ARNs del gen *CYP5* de diferentes longitudes en hojas de *A. thaliana* reducía los síntomas de infección por *F. graminearum* en hasta un 82% en comparación del control. Este resultado es comparable con lo observado en este trabajo empleando VIGS, donde se reportó una reducción del tamaño de la lesión de 3 cm presente en las plantas inoculadas únicamente con *Fusarium* sp. a 2 cm en las plantas que contenían el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. Con base en estos datos se sugiere que los mecanismos de silenciamiento presentarán diferentes respuestas y fenotipos, aún cuando se aplique a genes con actividades relacionadas o a la misma especie de hongo.

documented. *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) has served as a VIGS vehicle to express dsRNA targeting genes associated with the haustorium of *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* (*Pst*) (Yin *et al.*, 2011). These findings revealed that silencing was most effective in haustorium cells with greater contact with host cells (Yin *et al.*, 2011). Similarly, wheat plants employing BSMV as a VIGS tool were used to evaluate dsRNA targeting three *Puccinia triticina* (*Pt*) genes: *PtCYCI* (cyclophilin), *PtMAPK1* (a protein kinase), and *PtCNB* (a calcineurin regulatory subunit), all associated with pathogenicity. The study indicated that silencing any of these three target genes led to a reduction in lesion size during the infection process (Panwar *et al.*, 2013). In another instance, BSMV-mediated silencing of the *PstCFEM* effector gene in wheat plants resulted in decreased sporulation, leading to a significant reduction in fungal biomass and infection area (Bai *et al.*, 2022). In this study, the utilization of EuMV-YP as a VIGS vector resulted in observed reductions in foliar damage (leaf drop and wrinkling), as well as diminished lesion size following *Fusarium* sp. infection. These effects were attributed to the presence of the EuMV-YP $\Delta$ CHS4 VIGS vector. This suggests that VIGS vectors offer non-transgenic, environmentally friendly alternatives for studying and analyzing new tools against plant pathogens and insect pests (Coleman, 2016; Dinolfo *et al.*, 2017; Martín-Udíroz *et al.*, 2004), while also highlighting the application potential of EuMV-YP-based VIGS vectors.

Apart from the observed disparities in symptomatology between plants infected with *Fusarium* sp. and those treated with the VIGS EuMV-YP $\Delta$ CHS4 vector, compared to plants solely infected by *Fusarium* sp., notable silencing effects of up to 20% on the *CHS4* gene expression were evident in plants subjected to the E-CHS4

Si bien la técnica de HIGS se ha presentado como una estrategia para el estudio de la interacción hongo-planta, esta herramienta se realiza mediante la generación de plantas transgénicas capaces de producir ARNi (Nowara *et al.*, 2010; Panwar *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015), lo que provoca que tenga poca aceptación para su uso por los consumidores y poca confiabilidad debido al desconocimiento de sus repercusiones ambientales (Cai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016), por lo que el empleo de los vectores VIGS es un mecanismo alternativo al sistema HIGS, como parte de la nueva generación de fungicidas basados en ARNs (Padilla-Roji *et al.*, 2023).

Se ha reportado previamente la aplicación de VIGS para silenciar la expresión de genes de hongos, utilizando al *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) como vehículo VIGS, para expresar ARNs dirigidos a genes asociados al haustorio de *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* (*Pst*) (Yin *et al.*, 2011). Estos resultados mostraron que el silenciamiento fue más eficiente en las células del haustorio que estaban en mayor contacto con las células del hospedero (Yin *et al.*, 2011). Por otra parte, en plantas de trigo utilizando al BSMV como VIGS, se evaluaron ARNi contra tres genes de *Puccinia triticina* (*Pt*), el gen *PtCYCI* (cyclophilin), *PtMAPK1* (una proteína quinasa) y *PtCNB* (una unidad reguladora de calcineurina), los cuales participan en la patogenicidad. En este estudio se observó que el silenciamiento de cualquiera de los tres genes blanco produjo una disminución en el tamaño de la lesión ocasionada durante el proceso infectivo (Panwar *et al.*, 2013). Así mismo, el análisis del silenciamiento del efector *PstCFEM* de *Pst*, empleando BSMV en plantas de trigo, mostraron la reducción en la esporulación, lo que disminuyó significativamente la biomasa del hongo y el área de infección (Bai *et al.*, 2022). En este trabajo, empleando al EuMV-YP como vector VIGS, se observó la disminución del

treatment (Figure 5). Likewise, in plants treated with the O-CHS4 regimen, a significant silencing of 30% in the *CHS4* gene expression was evident (Figure 6). Nevertheless, the exclusive silencing of the *chitin synthase 4* gene proved insufficient to avert the progression of fungal infection, consequently leading to an inability for plant survival or recovery.

This loss of silencing effect could be attributed to the presence of multiple chitin synthases. It has been reported that disruptions in cell wall synthesis can trigger a compensatory response to safeguard fungal cell wall integrity. This response often involves heightened chitin synthesis through alternative chitin synthase members (Kappel *et al.*, 2020). Moreover, processes such as the overexpression of enzymes like deacetylases, which facilitate the conversion of chitin to chitosan, are also implicated (Kappel *et al.*, 2020). Furthermore, it's worth noting that the expression of one or more *chitin synthase* genes can be intricately tied to the developmental stage of the fungus (Roncero *et al.*, 2003; Kappel *et al.*, 2020). For instance, *F. oxysporum* mutants with single *chitin synthase* gene disruptions (1, 2, or 7) exhibited no discernible variations in colony morphology or chitin production when compared to the wild-type strain (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Conversely, the elimination of the *CHS5* gene in *F. oxysporum* strains led to swollen hyphae, demonstrating heightened sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Roncero *et al.*, 2003). This indicates that the loss of activity in a single *chitin synthase* gene can result in significant structural alterations. However, the impact of such loss on virulence or fungal development can vary across interactions. For instance, when an *F. oxysporum* strain with a lethal *CHS5* gene mutation infected tomato plants, it exhibited reduced efficiency in colonizing the tomato vascular system and slower growth (Madrid *et al.*, 2003). Conversely, the analysis of lethal

daño foliar (caída de las hojas y arrugamiento), así como la disminución del tamaño de la lesión por la infección con *Fusarium* sp., como efecto de la presencia del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. Lo anterior nos sugiere que la aplicación de vectores VIGS son alternativas no transgénicas, novedosas y amigables para el medio ambiente, así como para el estudio y análisis de nuevas herramientas contra el combate de patógenos y de plagas de insectos de plantas (Coleman, 2016; Dinolfo *et al.*, 2017; Martín-Udíroz *et al.*, 2004), así mismo, muestra las posibilidades de aplicación de vectores VIGS basados en el EuMV-YP.

Además de las diferencias observadas en la sintomatología de las plantas infectadas con *Fusarium* sp. y tratadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 en comparación con las plantas que solo fueron infectadas con *Fusarium* sp., también se observó el silenciamiento de hasta el 20% en la expresión del gen *CHS4* en las plantas con el tratamiento E-CHS4 (Figura 5) y de 30% de silenciamiento en las plantas con el tratamiento O-CHS4 (Figura 6). Con todo, el silenciamiento de solo el gen de quitina sintasa 4 no fue suficiente para evitar el desarrollo de la infección del hongo y por lo tanto no permitió la supervivencia o recuperación de las plantas.

Este efecto de pérdida de silenciamiento puede estar relacionado con la multiplicidad de las quitinas sintasas, ya que se ha reportado que la perturbación en la síntesis de la pared puede desencadenar una respuesta compensatoria para garantizar la integridad de la pared celular de hongos, principalmente un aumento en la síntesis de quitina a través de otros miembros de las quitina sintasa (Kappel *et al.*, 2020); pero también están involucrados procesos como la sobre-expresión de enzimas como las desacetilasas, que permiten la conversión de quitina a quitosano (Kappel *et al.*, 2020). Además, se ha observado que la expresión de uno o más genes de quitina sintasa está relacionada con

mutant strains of the *CHS1* and *CHS2* genes of *F. oxysporum* didn't yield effects on chitin content or sporulation, and viable mutants of the *CHS3* gene couldn't be obtained (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). In another vein, Cheng *et al.* (2015) demonstrated the expression of *CHS3* constructs that silenced gene expression in *F. graminearum* during its interaction with wheat plants, resulting in a remarkable 61% reduction in infected spikes.

The disruption of the *CHS4* gene didn't induce phenotypic changes in *B. cinerea*. In other species such as *Aspergillus* sp. and *Neurospora crassa*, where *CHS4* has been identified as an enzyme with overlapping function, its removal didn't result in conspicuous morphological shifts in the fungal wall. However, it did lead to a reduction in wall chitin concentration (Din *et al.*, 1996). A divergent scenario is seen in *Saccharomyces cerevisiae*, where the *CHS4* gene's product accounts for 90% of the cell wall chitin production and is also intertwined with the modulation of the sexual cycle (Morcx *et al.*, 2013). Similarly, silencing the *CHS4* gene in *Penicillium chrysogenum* diminished its expression by 91%, subsequently causing reduced colony size and a decreased count of conidia (Liu *et al.*, 2013). In contrast, for fungal species such as *F. oxysporum*, isolating *CHS4* proved challenging. Only through *in silico* analysis using *F. graminearum* data could the existence of one or more *CHS4* genes in *F. oxysporum* be ascertained, along with its connection to *CHS7* (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Thus, the application of VIGS technology for the analysis of multiple or challenging-to-isolate genes obviates the need for complete elimination. This approach allows for the study of essential genes, mutation of which proves lethal (Mascia *et al.*, 2014). In this study, transient silencing of the *Fusarium* sp. *CHS4* gene was achieved using VIGS. This transient silencing permits the examination of its plausible role in the infection process in *N. benthamiana*, and

la etapa de desarrollo del hongo (Roncero *et al.*, 2003; Kappel *et al.*, 2020). Por ejemplo: mutantes de *F. oxysporum* en un solo gen quitina sintasa (1, 2 o 7) no mostraron diferencias en la morfología de las colonias o la producción de quitina comparadas con la cepa silvestre (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Mientras que la eliminación del gen *CHS5* en cepas de *F. oxysporum* mostraron hifas hinchadas e hipersensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Roncero *et al.*, 2003), demostrando que la pérdida de actividad de un solo gen de quitina sintasa puede generar cambios estructurales importantes, mientras que en otras interacciones está perdida puede no influenciar en la virulencia o desarrollo del hongo: por ejemplo, en plantas de jitomate infectadas con una cepa de *F. oxysporum* con una mutante letal del gen *CHS5*, mostró una disminución en su capacidad para colonizar eficientemente el sistema vascular del jitomate, además de presentar menor tasa de crecimiento (Madrid *et al.*, 2003), mientras que el análisis de cepas mutantes letales de los genes *CHS1* y *CHS2* de *F. oxysporum* no generaron efectos en el contenido de quitina ni en la esporulación, además de que fue imposible obtener una mutante viable del gen *CHS3* (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Por otro lado, Cheng *et al.* (2015), expresaron construcciones del *CHS3* que silenciaron la expresión del gen en *F. graminearum* durante su interacción en plantas de trigo, lo que resultó en un 61% menos de espigas infectadas.

Por otro lado, la interrupción del gen *CHS4* no provocó cambios en el fenotipo de *B. cinerea*, pero en especies como *Aspergillus* sp. y *Neurospora crassa*, donde se ha reportado como una enzima con actividad redundante, su eliminación no produjo cambios morfológicos aparentes en la pared del hongo, pero generó una disminución en la concentración de quitina de la pared (Din *et al.*, 1996). En *Saccharomyces cerevisiae*, por el contrario, el producto del gen *CHS4*, es el responsable de la producción del 90% de la quitina de la pared

it also proposes the potential utilization of EuMV-YP-based VIGS vectors for the analysis of other genes within this gene family.

In both the E-CHS4 and O-CHS4 treatments, noticeable alleviation of symptoms was observed in *Fusarium* sp.-infected plants, irrespective of the timing of VIGS EuMV-YP $\Delta$ CHS4 vector inoculation. Prior studies by Villanueva-Alonzo *et al.* (2013) and Luna-Rivero *et al.* (2016) showcased the systemic and uniform movement of the pEuMV-YP: $\Delta$ AV1 vector during infection. This trait facilitates the evaluation of gene fragment replication. Thus, the observed silencing of the *Fusarium* sp. *CHS4* gene could be attributed to the translocation of RNAi from the infection site in *N. benthamiana* to encompass the entire plant and fungal cells. This systemic movement advantage characterizes VIGS-mediated silencing as distinct from other RNAi strategies in plants, where RNAi can traverse the organism systematically from the site of inoculation (Mascia *et al.*, 2014).

A plethora of studies underscore the bidirectional exchange of RNAs and RNAi across diverse kingdoms during plant-pathogen interactions. This process empowers pathogens to curtail plant defenses while concurrently furnishing plants with up to 60% disease resistance (Mapuranga *et al.*, 2023). The bidirectional nature of this exchange engenders evidence of such phenomena. For instance, Zhang *et al.* (2016) noted that when isolating the fungus *Verticillium dhaliae* from cotton plants, the obtained microRNA sequences primarily aligned with cotton microRNA sequences rather than those of the fungus. This observation implies that these RNAs were transported from cotton to the fungus during the infection process.

Likewise, evidence of the capacity of *B. cinerea* fungal cells to absorb plant exosomes emerged via *in vitro* exposure of the fungus to TET8-GFP-labeled exosomes from *A. thaliana*. The uptake

celular y además está relacionado con el cambio en el ciclo sexual (Morcx *et al.*, 2013). Así mismo, el silenciamiento del gen *CHS4* de *Penicillium chrysogenum*, disminuyó 91% de la expresión del gen lo que resultó en la reducción del tamaño de la colonia y del número de conidios (Liu *et al.*, 2013). Por lo contrario, en especies de hongos como *F. oxysporum*, el aislamiento de *CHS4* no fue posible y solo mediante análisis *in silico* con datos de *F. graminearum*, se determinó la existencia de uno o más genes *CHS4* en *F. oxysporum*, así como su relación con *CHS7* (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Por ello, el análisis de genes múltiples o genes difíciles de aislar mediante la tecnología VIGS evita la necesidad de eliminarlos completamente, lo que permite estudiar genes esenciales, cuya mutación es letal (Mascia *et al.*, 2014). En este trabajo, mediante VIGS se observó el silenciamiento transitorio de *CHS4* de *Fusarium* sp., lo que permite analizar su posible participación en el proceso de infección en *N. benthamiana* y sugiere la posible aplicación de vectores VIGS basados en EuMV-YP, para el análisis de otros genes pertenecientes a esta familia.

Con respecto a los resultados obtenidos en ambos tratamientos, E-CHS4 y O-CHS4, se observó una disminución de los síntomas en las plantas infectadas con el hongo, independientemente del momento de inoculación con el vector VIGS EuMV-YP $\Delta$ CHS4. Previamente, Villanueva-Alonzo *et al.* (2013) y Luna-Rivero *et al.* (2016) demostraron que el vector pEuMV-YP: $\Delta$ AV1 se mueve de manera sistémica y uniforme durante la infección, permitiendo la replicación del fragmento del gen a evaluar, por lo que el silenciamiento observado del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. puede deberse al movimiento de los ARNi del sitio de infección en *N. benthamiana* hacia toda la planta y a las células del hongo. Esta es una ventaja del silenciamiento mediado por VIGS sobre otros enfoques de ARNi en las plantas, donde los ARNi pueden moverse de

of exosomes by fungal cells was confirmed as they were found inside the fungal cells two hours after exposure, persisting until cellular lysis with Triton X-100 (Cai *et al.*, 2018). Additionally, studies have indicated that spraying dsRNA onto barley leaves impeded *F. graminearum* infection by approximately 50% through constructs targeting *AGO* and *DCL* genes. Notably, these genes contribute not only to silencing but also to mycotoxin production and disease progression in *F. graminearum*. This observation highlights fungal pathogens' ability to absorb environmental RNA (Werner *et al.*, 2020).

The achieved results underscore that VIGS technology facilitates gene analysis in plant-fungus interactions without necessitating protocols for fungal transformation or generation of transgenic plants, unlike methodologies such as HIGS (Hua *et al.*, 2018). Moreover, it obviates the reliance on obtaining resistant cultivars and mitigates the risk of instability inherent to dsRNA-based SIGS methodologies (Hua *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONS

The VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, derived from EuMV-YP, exhibited the capacity to partially suppress the *CHS4* gene amid the *Fusarium* sp. infection in *N. benthamiana* plants. The principal consequence of silencing, brought about by the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, lay in the alleviation of symptoms. These included diminished leaf drop, reduced lesion size on the stem, and a curbed loss of turgor in the plants. The assessment of this VIGS vector within the context of plant-pathogen interaction illuminates its potential in deciphering gene significance in fungal viability and pathogenicity.

manera sistémica desde el sitio de inoculación hacia todo el organismo (Mascia *et al.*, 2014).

Diversos estudios han demostrado que el intercambio de ARNs y ARNi entre diferentes reinos durante la interacción planta-patógeno, es un proceso bidireccional que permite a los patógenos suprimir la defensa de las plantas, pero que también proporciona a las plantas resistencia a las enfermedades hasta en un 60% (Mapuranga *et al.*, 2023). Al ser un proceso bidireccional entre patógeno y hospedero, es posible encontrar evidencia de estos intercambios, por ejemplo: Zhang *et al.* (2016), reportaron que al aislar el hongo *Verticillium dahliae* de plantas de algodón, obtuvieron secuencias de microARN que eran compatibles principalmente con secuencias de microARN de algodón más que con el hongo, lo que sugiere que estos ARNs se transportaron del algodón al hongo durante el proceso de infección. En otro reporte se demostró la capacidad de las células fúngicas de *B. cinerea* para absorber exomas de plantas, a través de la exposición *in vitro* del hongo con exomas de *A. thaliana* marcados con TET8-GFP (un marcador específico de exomas, similar al observado en mamíferos). Se concluyó que después de dos horas los exomas se encontraban dentro de las células fúngicas y se mantuvieron hasta que éstas fueron lisadas con Tritón X-100 (Cai *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha reportado que la aspersión de ARNs sobre hojas de cebada inhibió cerca del 50% de la infección con *F. graminearum* mediante construcciones cuyo blanco fueron los genes *AGO* y *DCL* (genes que además de participar en el silenciamiento, en *F. graminearum* contribuyen en la producción de micotoxinas y en el desarrollo de la enfermedad en la planta); esto demuestra la capacidad de los patógenos fúngicos para absorber los ARN del ambiente (Werner *et al.*, 2020).

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by the FORDECYT project titled “Generation of scientific-technological strategies with a multidisciplinary and inter-institutional approach to address the threat posed by ambrosia complexes in the agricultural and forestry sectors of Mexico” (#No. 292399). We would like to acknowledge the doctoral scholarship awarded to Nidia Esther Hau Yama by the National Council of Science and Technology “CONACYT” (CVU: 694530). Our gratitude goes to IQI. Alberto Cortés Velázquez for his assistance with qPCR and to M.C. Bartolomé Chí Manzanero (qepd) for his contributions in caring for the fungus.

**CITED LITERATURE**

- Bai X, Peng H, Goher F, Islam MA, Xu S, Guo J, Kang Z and Guo J. 2022. A candidate effector protein PstCFEM1 contributes to virulence of stripe rust fungus and impairs wheat immunity. *Stress Biology* 2: 21. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00042-5>
- Baulcombe DC. 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 2(2): 109–113. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80022-3)
- Baulcombe DC. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431(1): 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
- Becker A and Lange M. 2010. VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science* 15(1): 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.002>
- Bekele D, Tesfaye K and Fikre A. 2019. Applications of virus induced gene silencing (VIGS) in plant functional genomics studies. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology* 7(1): 1–7. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000229>
- Cai Q, He B, Weiberg A, Buck AH and Jin H. 2019. Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLoS Pathogens* 15(12): 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008090>
- Cai Q, Qiao L, Wang M, He B, Lin FM, Palmquist J, Huang SD and Jin H. 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360(6393): 1126-1129. <https://doi.org/10.1126/ciencia.aar4142>
- Carreras-Villaseñor N, Rodríguez-Haas JB, Martínez-Rodríguez LA, Pérez-Lira AJ, Ibarra-Laclette E, Villafán E, Castillo-Díaz AP, Ibarra-Juárez LA, Carrillo-Hernández ED and Sánchez-Rangel D. 2022. Characterization of two *Fusarium solani* species complex isolates from the ambrosia beetle *Xylosandrus morigerus*. *Journal of Fungi* 8(3): 231. <https://doi.org/10.3390/jof8030231>
- Chen W, Kastner C, Nowara D, Oliveira-Garcia E, Rutten T, Zhao Y, Deising HB, Kumléhn J and Schweizer P. 2016.

Los resultados obtenidos mostraron que la tecnología VIGS permite el análisis de un gen durante la interacción planta-hongo, sin la necesidad de desarrollar protocolos para la transformación de hongos o la generación de plantas transgénicas, como sucede con metodologías como HIGS (Hua *et al.*, 2018), así como evitar la dependencia a la obtención de cultivares resistentes o el riesgo de la inestabilidad que pueden presentar los ARNs en la metodología SIGS (Hua *et al.*, 2018).

**CONCLUSIONES**

El vector VIGS EuMV-YPΔCHS4, basado en el EuMV-YP, tuvo la capacidad de silenciar parcialmente al gen *CHS4*, durante el proceso infectivo de *Fusarium* sp. en plantas de *N. benthamiana*. El principal efecto del silenciamiento provocado por el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 fue la reducción de síntomas como menor caída de hojas, disminución del tamaño de la lesión en tallo, así como menor pérdida de turgencia en las plantas. La evaluación de este vector VIGS durante la interacción planta- patógeno, demuestra su potencial para estudiar la importancia de los genes en la viabilidad o patogenicidad de los hongos.

**AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el proyecto FORDECYT “Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México” (#No. 292399). Agradecemos la beca de doctorado otorgada a Nidia Esther Hau Yama (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “CONACYT”, CVU:694530). Agradecemos al IQI. Alberto Cortés Velázquez por su apoyo con el qPCR y al M.C Bartolomé Chí Manzanero (qepd) por su apoyo en el cuidado del hongo.

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

- Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. *Journal of Experimental Botany* 67(17): 4979–4991. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw263>
- Cheng W, Song XS, Li HP, Cao LH, Sun K, Qiu XL, Xu YB, Yang, P, Huang T, Zhang JB, Qu B and Liao YC. 2015. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 13(9): 1335–1345. <https://doi.org/10.1111/pbi.12352>
- Coleman JJ. 2016. The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology* 17(2): 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Delgado-Baquerizo M, Guerra CA, Cano-Díaz C, Egidí E, Wang JT, Eisenhauer N, Singh BK and Maestre FT. 2020. The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale. *Nature Climate Change* 10(6): 550–554. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-0759-3>
- Din AB, Specht CA, Robbins P.W and Yarden O. 1996. Chs-4, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics MGG* 250(2): 214–222. <https://doi.org/10.1007/BF02174181>
- Dinolfo MI, Castañares E and Stenglein SA. 2017. *Fusarium*–plant interaction: state of the art – a review. *Plant Protection Science* 53(2): 61–70. <https://doi.org/10.17221/182/2015-PPS>
- Fernandez-San Millan A, Larraya L, Farran I, Ancin M and Veramendi J. 2021. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control* 160: 104683. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104683>
- Geoghegan I, Steinberg G and Gurr S. 2017. The role of the fungal cell wall in the infection of plants. *Trends in Microbiology* 25(12): 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.015>
- Gerard GF, Fox DK, Nathan M and D’Alessio JM. 1997. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Molecular Biotechnology* 8(1):61-77. <https://doi.org/10.1007/BF02762340>
- Ghag SB, Shekhawat UKS, and Ganapathi TR. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal* 12(5): 541–553. <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
- Hall TA. 1999. BioEdit a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98. https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT
- Höfle L, Biedenkopf D, Werner BT, Shrestha A, Jelonek L and Koch A. 2020. Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium* CYP51 genes. *RNA biology* 17(4): 463–473. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700033>
- Hua C, Zhao JH and Guo HS. 2018. Trans-kingdom RNA silencing in plant–fungal pathogen interactions. *Molecular plant* 11(2): 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.001>
- Kappel L, Münsterkötter M, Sipos G, Rodriguez CE and Gruber S. 2020. Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. *PLoS Pathogens* 16(2): e1008320. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008320>
- Koch A, Kumar N, Weber L, Keller H, Imani J and Kogel KH. 2013. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(48): 19324–19329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306373110>
- Lange M, Yellina AL, Orashakova S and Becker A. 2013. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. Pp: 1-14. *In: Becker A(ed). Virus-Induced gene silencing: Methods and protocols; Methods in molecular biology, Humana Press. Gieben, Alemania. 975p.* https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0_1
- Larson TM, Kendra DF, Busman M and Brown DW. 2011. *Fusarium verticillioides* chitin synthases *CHS5* and *CHS7* are required for normal growth and pathogenicity. *Current Genetics* 57(3): 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0334-6>
- Lenardon MD, Munro CA and Gow NAR. 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 13(4): 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>
- Liu H, Wang P, Gong G, Wang L, Zhao G and Zheng Z. 2013. Morphology engineering of *Penicillium chrysogenum* by RNA silencing of chitin synthase gene. *Biotechnology Letters* 35(3): 423–429. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1099-9>
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luna-Rivero MS, Hernández-Zepeda C, Villanueva-Alonzo H, Minero-García Y, Castell-González SE and Moreno-Valenzuela OA. 2016. Expression of genes involved in the salicylic acid pathway in type h1 thioredoxin transiently silenced pepper plants during a begomovirus compatible interaction. *Molecular Genetics and Genomics* 291(2): 819–830. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1148-x>
- Madrid MP, Di Pietro A and Roncero MIG. 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Molecular Microbiology* 47(1): 257–266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03299.x>
- Majumdar R, Rajasekaran K and Cary JW. 2017. RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science* 8: 200. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00200>
- Martin-Udíroz M, Madrid MP and Roncero MIG. 2004. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150(10): 3175–3187. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27236-0>
- Mascia T, Nigro F, Abdallah A, Ferrara M, de Stradis A, Faedda R, Palukaitis P and Gallitelli D. 2014. Gene silencing and

- gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(11): 4291–4296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315668111>
- Mapuranga J, Chang J, Zhang L, Zhang N, Yang W. 2022. Fungal secondary metabolites and small RNAs enhance pathogenicity during plant-fungal pathogen interactions. *Journal Fungi* 20;9(1):4. <https://doi.org/10.3390/jof9010004>
- Morcx S, Kunz C, Choquer M, Assie S, Blondet E, Simond-Côte E, Gajek K, Chapeland-Leclerc F, Expert D and Soulie MC. 2013. Disruption of *Bcchs4*, *Bcchs6* or *Bcchs7* chitin synthase genes in *Botrytis cinerea* and the essential role of class VI chitin synthase (*Bcchs6*). *Fungal Genetics and Biology* 52: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.11.011>
- Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J and Schweizer P. 2010. HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell* 22(9): 3130–3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- Pacheco-Arjona JR and Ramirez-Prado JH. 2014. Large-scale phylogenetic classification of fungal chitin synthases and identification of a putative cell-wall metabolism gene cluster in aspergillus genomes. *PLoS ONE* 9(8): e104920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104920>
- Padilla-Roji I, Ruiz-Jiménez L, Bakhat N, Vielba-Fernández A, Pérez-García A and Fernández-Ortuño D. 2023. RNAi Technology: A new path for the research and management of obligate biotrophic phytopathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 24(10): 9082. <https://doi.org/10.3390/ijms24109082>
- Panth M, Hassler SC and Baysal-Gurel F. 2020. Methods for management of soilborne diseases in crop production. *Agriculture* 10(1): 16. <https://doi.org/10.3390/agriculture10010016>
- Panwar V, McCallum B and Bakkeren G. 2013. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the *Barley stripe mosaic virus*. *Plant Molecular Biology* 81(6): 595–608. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0022-7>
- Roncero MIG, Hera C, Ruiz-Rubio M, García-Maceira FI, Madrid MP, Caracuel Z, Calero F, Delgado-Jarana J, Roldán-Rodríguez R, Martínez-Rocha AL, Velasco C, Roa J, Martín-Urdiroz M, Córdoba D and Di Pietro A. 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62(2): 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00043-2)
- RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated development environment for R. Rstudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>
- Sampaio AM, de Sousa Araújo S, Rubiales D and Patto MCV. 2020. *Fusarium* wilt management in legume crops. *Agronomy* 10(8): 1073. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081073>
- Sharma IP and Sharma AK. 2020. *Trichoderma-Fusarium* Interactions: A Biocontrol Strategy to Manage Wilt pp. 167–185. *In: Sharma, A. K and Sharma, P. (eds). Trichoderma: Host pathogen interactions and applications*, Springer nature Singapore. Pantnagar, Uttarakhand, India. 331p. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_9
- Summerell BA. 2019. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annual Review of Phytopathology* 57(1): 323–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tinoco MLP, Dias BBA, Dall'Assta RC, Pamphile JA and Aragão FJL. 2010. *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. *BMC Biology* 8(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-27>
- Van Kammen A. 1997. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science* 2(11): 409–411. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01128-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01128-X)
- Villanueva-Alonzo HJ, Us-Camas RY, López-Ochoa LA, Robertson D, Guerra-Peraza O, Minero-García Y and Moreno-Valenzuela OA. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters* 35(5): 811–823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>
- Wang M, Weiberg A, Dellota E, Yamane D and Jin H. 2017. *Botrytis* small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology* 14(4): 421–428. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1291112>
- Wang M, Weiberg A, Lin FM, Thomma BPHJ, Huang H Da and Jin H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants* 2(10), 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Weiberg A, Bellinger M and Jin H. 2015. Conversations between kingdoms: Small RNAs. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.025>
- Werner BT, Gaffar FY, Schuemann J, Biedenkopf D and Koch AM. 2020. RNA-spray-mediated silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL genes improve barley disease resistance. *Frontiers in Plant Science* 11:476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- Yin C, Jurgenson JE and Hulbert SH. 2011. Development of a Host-Induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(5): 554–561. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0229>
- Zhang T, Zhao Y-L, Zhao J-H, Wang S, Jin Y, Chen Z-Q, Fang Y-Y, Hua C-L, Ding S-W and Guo HS. 2016. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants* 2(10): 16153. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153>
- Zhu C, Liu T, Chang YN and Duan CG. 2019. Small RNA functions as a trafficking effector in plant immunity. *International Journal of Molecular Sciences* 20(11): 2816. <https://doi.org/10.3390/ijms20112816>

Pathogenicity, virulence and *in vitro* sensitivity of *Elsinoe perseae* (= *Sphaceloma perseae*) isolates to different fungicides

Patogenicidad, virulencia y sensibilidad *in vitro* de aislados de *Elsinoe perseae* (= *Sphaceloma perseae*) a diferentes fungicidas

Edna Esquivel-Miguel, José Luciano Morales-García*, Martha Elena Pedraza-Santos, Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas, Facultad de Agrobiología Presidente “Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas No. 2290, Colonia Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán, México, C. P. 60170; Soledad García-Morales, Unidad de Biotecnología Vegetal, CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero No. 1227, Zapopan, Jalisco, México, C. P. 45019; Samuel Pineda-Guillermo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia Zinapécuaro, Km. 9.5, Tarímbaro, Michoacán, México, C. P. 58880.

*Corresponding author: jose.morales@umich.mx

Received: February 10, 2023.

Accepted: August 29, 2023.

Esquivel-Miguel E, Morales-García JL, Pedraza-Santos ME, Chávez-Bárceñas AT, García-Morales S and Pineda-Guillermo S. 2023. Pathogenicity, virulence and *in vitro* sensitivity of *Elsinoe perseae* (= *Sphaceloma perseae*) isolates to different fungicides. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 460-478.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-3>

First DOI publication: August 31, 2023.

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2023

Abstract. *Elsinoe perseae* (= *Sphaceloma perseae*) is the causal agent of the Mancha purpura or scab in avocado (*Persea americana*). In this study, the pathogenicity and virulence of *E. perseae* isolates from different agroecological

Resumen. *Elsinoe perseae* (= *Sphaceloma perseae*) es el agente causal de la enfermedad conocida como mancha púrpura o roña del aguacate (*Persea americana*). En este estudio se determinó la patogenicidad y virulencia de aislados de *E. perseae* procedentes de distintas áreas agroecológicas productoras de Michoacán, México. Se utilizaron plantas de vivero con frutos de aguacate de las variedades Flor de María y Méndez. Además, se evaluó la sensibilidad de los aislados *in vitro* a fungicidas químicos (azoxystrobin, tiabendazol, pyraclostrobin, cyprodinil+fludioxonil y azoxystrobin + propiconazol) y autorizados para su uso en huertos con manejo orgánico (sulfato de cobre, gluconato de cobre, oxiclورو de cobre y el extracto vegetal *Larrea tridentata*). Los síntomas de mancha púrpura observados en los frutos inoculados coincidieron

producing areas of Michoacán, Mexico will be reduced. For this, nursery plants with avocado fruits of Flor de María and Méndez varieties were used. On the other hand, the *in vitro* sensitivity of chemical fungicides (azoxystrobin, thiabendazole, pyraclostrobin, cyprodinil + fludioxonil and azoxystrobin + propiconazole) and authorized for use in orchards with organic management (copper sulfate, copper gluconate, copper oxychloride and the plant extract *Larrea tridentata*). The observed symptoms of Mancha purpura in the inoculated fruits were corroborated with those described for *E. perseae* in avocado. Inoculated fruits Flor de María variety shows the highest susceptibility to the pathogen. The isolates of *E. perseae* presented different degrees of virulence. The isolates showed different *in vitro* sensitivity values to the fungicides evaluated in the experiment. The pathogen showed the most sensitivity *in vitro* to chemical fungicides: thiabendazole and azoxystrobin + propiconazole (100% inhibition), and to those authorized in orchards with organic management: *L. tridentata* and copper oxychloride (on average 58% inhibition).

Keywords: Mancha purpura, susceptibility, sensitivity, *Persea americana*.

Among the diseases that afflict avocado cultivation (*Persea americana*), economically significant conditions include anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), purple scab (*Elsinoe persea*), peduncle discoloration associated with phytopathological and nutritional issues, avocado decline (*Phytophthora cinnamomi*), and postharvest diseases. Collectively, these maladies can impact up to 40% of the yield and contribute to elevated production costs, necessitating up to six applications of fungicides per season for

con los descritos de *E. perseae* en aguacate. Las plantas variedad Flor de María inoculadas mostraron la mayor susceptibilidad al patógeno comparada con Méndez. Los aislados de *E. perseae* presentaron diferentes grados de virulencia. Los aislados seleccionados mostraron diferentes valores de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas evaluados en la experimentación. El patógeno mostró mayor sensibilidad *in vitro* a los fungicidas químicos: tiabendazol y azoxystrobin + propiconazol (100% de inhibición), y a los autorizados en huertos con manejo orgánico: *L. tridentata* y oxiclورو de cobre (en promedio un 58% de inhibición).

Palabras claves: Mancha púrpura, susceptibilidad, sensibilidad, *Persea americana*.

De las enfermedades que atacan al cultivo de aguacate (*Persea americana*), se consideran de importancia económica la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), la roña o mancha púrpura (*Elsinoe persea*), el anillamiento del pedúnculo asociado a problemas fitopatológicos y nutricionales, la tristeza del aguacatero (*Phytophthora cinnamomi*) y enfermedades postcosecha, afectando la cantidad y calidad de los frutos (CEDRSSA, 2017). En conjunto, estas enfermedades afectan hasta un 40% de la producción, considerándose un factor que incrementa los costos de producción, al requerir hasta seis aplicaciones de fungicidas por temporada para su control, acompañado de otras prácticas de manejo y labores culturales (Alfaro-Espino *et al.*, 2017).

La roña o mancha púrpura, se caracteriza por presentar manchas pequeñas color púrpura que conforme avanza la enfermedad se hacen más grandes y coalescen formando una mancha corchosa color café, que, aunque no llega a dañar la pulpa, afecta su calidad y es rechazada en el mercado internacional (Everett *et al.*, 2010; Morales, 2017),

management, alongside other handling practices and cultural tasks (Alfaro-Espino *et al.*, 2017).

Purple scab, also known as “sarna” or purple spot, manifests as small purple spots that enlarge and converge, resulting in corky brown patches as the disease progresses. While it does not harm the pulp directly, it impairs fruit quality and renders it unsuitable for the international market (Everett *et al.*, 2010; Morales, 2017), thereby diminishing production value by as much as 60% (Alfaro-Espino *et al.*, 2017).

The causal agent responsible for scab or purple spot is *Elsinoe perseae*. This microorganism exhibits significant morphological variability among its isolates. These isolates present a spectrum of colors, ranging from orange to light yellow, which gradually darken with age, ultimately taking on shades of red or reddish-brown. The growth rate of this fungus is rather slow, typically falling within the range of 29 to 35 mm/day. Its texture varies from viscous to cerebroid, and its shapes range from circular to irregular. A notable feature of *E. perseae* is its production of elsinochromes, pigments that come in red or orange hues and have the potential to become toxic to the host plant itself (Everett *et al.*, 2010; Morales, 2022).

In the context of *Elsinoe* species, elsinochromes play a pivotal role in influencing virulence. These pigments facilitate the invasion and colonization of the host, all while providing essential nutrients to the fungus (Chung, 2011). It has also been observed that pigment production correlates with susceptibility, potentially serving as a defense mechanism against certain antifungal products that could be detrimental to the fungus (Fuentes *et al.*, 2014).

A critical aspect of disease management involves the ability to distinguish the damage inflicted by *E. perseae* in the field from that caused by other factors, both biotic (pests) and abiotic (mechanical

afectando el valor de la producción hasta un 60% (Alfaro-Espino *et al.*, 2017).

El agente causal de la roña o mancha púrpura es *Elsinoe perseae* que se caracteriza por presentar gran variabilidad morfológica en sus aislados, variación en colores naranjas, amarillos claros, que con la edad se van oscureciendo, tornándose rojos o cafés rojizos. Este hongo presenta lento crecimiento, con una tasa de entre 29 a 35 mm/día, textura que va de viscosa a tipo cerebroide, formas de circular a irregular, y además producción de elsinocromos, que son pigmentos rojos o naranjas que llegan a ser tóxicos para la planta (Everett *et al.*, 2010; Morales, 2022).

Los elsinocromos en las especies del género *Elsinoe* influyen en su virulencia, ya que le permiten al hongo invadir al huésped, permanecer en el huésped y además le proporcionan nutrientes (Chung, 2011). La producción de estos pigmentos se ha relacionado con la sensibilidad, ya que pueden llegar a proteger al hongo de algunos productos antimicóticos (Fuentes *et al.*, 2014).

Parte importante en el control de esta enfermedad es diferenciar en campo los daños ocasionados por *E. perseae* de los ocasionados por otros factores bióticos (plagas) y abióticos (daños mecánicos) que pueden provocar corchosis en el epicarpio del fruto como mecanismos de defensa de la planta y confundirse con el síntoma principal provocado por *E. perseae* (Morales, 2022). Esto para evitar el uso innecesario de fungicidas, ya que además de la antracnosis ocasionada por *C. gloeosporioides*, la roña es la enfermedad a la que se dirige el mayor número de aplicaciones de fungicidas para su prevención y control (Marroquín, 1999).

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la patogenicidad y virulencia de aislados de *E. perseae* provenientes de diferentes áreas agroecológicas y determinar el producto más efectivo para su control *in vitro*, utilizando los fungicidas

damage). These factors can also trigger corkosis in the fruit epicarp, a defense mechanism that might be mistaken for the primary symptom caused by *E. perseae* (Morales, 2022). The accurate differentiation of these factors is crucial to prevent unnecessary fungicide application. This is especially pertinent given that, in addition to anthracnose stemming from *C. gloeosporioides*, scab receives a substantial portion of fungicide treatments for prevention and control (Marroquín, 1999).

The aims of this study encompassed an assessment of the pathogenicity and virulence of *E. perseae* isolates originating from diverse agroecological regions. Additionally, the research sought to identify the optimal product for *in vitro* control, focusing on a selection of chemical fungicides: azoxystrobin, thiabendazole, pyraclostrobin, cyprodinil+fludioxonil, as well as azoxystrobin + propiconazole. Concurrently, the study explored products sanctioned for employment in organic orchard management, specifically: copper sulfate, copper gluconate, copper oxychloride, and a plant extract derived from *Larrea tridentata*.

MATERIALS AND METHODS

Isolates of *E. perseae*. Five isolates of *E. perseae* were selected from a larger pool of 25, all collected from various agroecological zones within Michoacán. These isolates are stored in the Collection of Phytopathogenic Fungi at the Facultad de Agronomía “Presidente Juárez” of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, located in Uruapan, Michoacán.

To determine the isolates for examination, the sampling areas were categorized based on their

químicos: azoxystrobin, tiabendazol, pyraclostrobin, cyprodinil+fludioxonil y azoxystrobin + propiconazol y autorizados para uso en huertos con manejo orgánico: sulfato de cobre, gluconato de cobre, oxiclóruo de cobre y el extracto vegetal (*Larrea tridentata*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *E. perseae*. Se utilizaron cinco aislados de *E. perseae*, de un total de 25 provenientes de distintas áreas agroecológicas de Michoacán, que se encuentran en la Colección de Hongos Fitopatógenos de la Facultad de Agronomía “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

Para la selección de los aislados, se consideraron áreas agroecológicas de muestreo, que se dividieron con base a la altura en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Se consideró la altura óptima para el desarrollo del cultivo del aguacate de 1200-2300 m.s.n.m., obteniendo un total de cinco áreas. De cada área se seleccionó al azar un aislado: 1; aislado de Cerro Colorado ECC (1200-1420 m.s.n.m.), 2; Zumpimito EZU (1421-1620 m.s.n.m.), 3; Zancandaro EZA (1621-1820 m.s.n.m.), 4; Ario de rosales EAR (1821-2080 m.s.n.m.) y 5; aislado de Canacuas ECA (2081-2300 m.s.n.m.). Debido al lento crecimiento (tasa de 0.29 a 0.35 mm por día) solo cinco aislados fueron evaluados en esta investigación.

Para realizar las pruebas *in vitro* y de patogenicidad, se reactivaron las cepas y se sembraron en medio de cultivo PDA (10 mL por caja). Las condiciones en las que se mantuvieron fueron a 28 °C y 80% de humedad. Se generaron un total de 60 réplicas (seis por área).

elevation in meters above sea level (m.a.s.l.). The altitude range of 1200-2300 m.a.s.l. was identified as optimal for avocado cultivation, leading to the identification of five distinct areas. Within each of these areas, a single isolate was randomly chosen as follows: 1) ECC isolate from Cerro Colorado (1200-1420 m.a.s.l.), 2) EZU isolate from Zumpimito (1421-1620 m.a.s.l.), 3) EZA isolate from Zacandaro (1621-1820 m.a.s.l.), 4) EAR isolate from Ario de Rosales (1821-2080 m.a.s.l.), and 5) ECA isolate from Canacuas (2081-2300 m.a.s.l.). Given their slow growth, with a rate of 0.29 to 0.35 mm per day, only these five isolates were considered for evaluation in this investigation.

To conduct *in vitro* and pathogenicity assessments, the strains were reactivated and introduced into Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium, with each dish holding 10 mL of the medium. These cultures were kept under controlled conditions of 28 °C temperature and 80% humidity. The experimentation resulted in the creation of 60 replicates, with six replicates established for each of the specified areas.

***E. perseae* pathogenicity and virulence assays.**

One-year-old nursery avocado plants of the Flor de María and Méndez varieties were used. These plants bore 6-9 cm fruits, corresponding to the fruit filling stage. These varieties were chosen due to known susceptibility to this fungus from earlier research. Notably, the Méndez variety is owned by the Californian Brokaw nursery, while the Flor de María variety is undergoing registration for plant breeders' rights (Compean, 2020). The plants were housed at the nursery of the Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez."

One month before starting the experiment, the plants were treated with Switch® fungicide (1 g per liter of water) and Oleotech higuierilla

Ensayos de patogenicidad y virulencia de *E. perseae*. Se utilizaron plantas de aguacate de vivero de un año de edad de las variedades Flor de María y Méndez, con frutos de 6-9 cm (etapa de llenado de fruto). Estas variedades se seleccionaron ya que en estudios previos se observó su susceptibilidad a dicha hongo. La variedad Méndez, son propiedad del vivero californiano Brokaw y Flor de María está en proceso de registro de derechos de obtentor (Compean, 2020). Las plantas se mantuvieron en el vivero de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Un mes antes del inicio del experimento las plantas se trataron con el fungicida Switch® (1 g L⁻¹ de agua) y Oleotech higuierilla (0.35 mL L⁻¹ agua). Lo anterior para eliminar posibles patógenos. También se fertilizaron con fosfato monopotásico (2 g por planta) y se regaron cada tercer día con aproximadamente 2 L de agua por planta para mantenerlas sanas.

Se realizó una doble inoculación, primero, con un alfiler entomológico del número cero se realizaron de 8 a 10 punciones en el epicarpio del fruto de aguacate en un área de aproximadamente 1.5 cm de diámetro para facilitar la entrada del hongo. Posteriormente, sobre el área de las punciones, con ayuda de un sacabocados se colocó una porción (5 mm de diámetro) de medio de cultivo PDA con crecimiento de *E. perseae*. Por otro lado, se realizó otra inoculación, utilizando una porción de algodón que contenía suspensión de esporas a una concentración de 1 x 10⁶ conidios mL⁻¹. La edad del hongo al momento de inoculación fue de cinco meses. Posteriormente, cada fruto de aguacate se cubrió, durante tres días, con papel parafilm y con una bolsa de polietileno, la cual funcionó como cámara húmeda.

Para medir la virulencia, se consideraron los siguientes parámetros: días en los que se presentaron los primeros síntomas, número y tamaño de manchas y caída del fruto. Las observaciones se

(0.35 mL per liter of water) to eliminate potential pathogens. Additionally, the plants received 2 g monopotassium phosphate fertilizer each and were irrigated every third day with approximately 2 liters of water per plant to maintain health.

A double inoculation was carried out on avocado fruits. Firstly, 8-10 holes were created in an approximately 1.5 cm diameter area of the avocado's outer skin using a fine entomological pin (number zero). This was done to make it easier for the fungus to enter. Following this, a piece of PDA culture medium containing *E. perseae* growth, with a diameter of 5 mm, was placed on the punctured area using a punch tool.

In addition to this method, another type of inoculation was performed. This involved putting a piece of cotton soaked in a spore suspension with a concentration of 1×10^6 conidia mL⁻¹ onto the avocado fruit. The fungus used for inoculation was five months old. After inoculation, each avocado fruit was covered with parafilm paper and then enclosed in a polyethylene bag. This created a humid environment and was maintained for a period of three days.

To assess the virulence of the fungus, several parameters were monitored over a span of 150 days. These parameters included the number and size of spots that appeared on the fruit, the time it took for the first symptoms to show, and the rate of fruit drop. Observations were conducted every three days throughout this 150-day period.

The experimental design followed a complete randomization approach. This involved using five different isolates, with each isolate having three replicates. Additionally, there was an absolute control group with no inoculation. Each individual avocado fruit served as a replicate in this setup. To analyze the data, statistical methods were employed, including Tukey's test with a significance level set at $P < 0.05$.

realizaron cada tercer día durante en un periodo de 150 días.

El diseño experimental fue completamente al azar de los cinco aislados, con tres repeticiones más un testigo absoluto, sin inocular. Se contó cada fruto de la planta como una repetición. Se realizaron análisis estadísticos y pruebas de Tukey con $P < 0.05$.

Sensibilidad de aislados de *E. perseae* a diferentes fungicidas *in vitro*. Se utilizaron cinco fungicidas químicos (Azoxystrobin 25SC 0.4 mL PF/L agua, Tiabendazol 60WP 0.6 g PF/L, Pyraclostrobin 25CE 1.0 mL PF/L, Ciprodinil+Fludioxonil 62.5WG 1.0 g PF/L y Azoxystrobin+Propiconazol 20SE 0.4 mL PF/L) y cuatro productos autorizados para su uso en huertos con manejo orgánico (Sulfato de cobre 1.0g PF/L, Gluconato de cobre 2.0 mL PF/L, Oxiclورو de cobre 1.0 g PF/L y extracto de *Larrea tridentata* 2.0 mL PF/L). Los productos fueron evaluados con los cinco aislados de *E. perseae*. En cada uno de estos compuestos se usó la dosis del producto formulado (PF). También se incluyó un tratamiento testigo sin fungicida. El diseño fue completamente al azar, para cada fungicida y aislamiento del hongo se tuvieron cinco repeticiones, una repetición fue representada por una caja Petri.

Para el bioensayo se utilizó medio de cultivo PDA. Después del proceso de esterilización del PDA, el medio se mantuvo a 50 °C en matraces Erlenmeyer y por cada matraz se agregó la dosis previamente mencionada de cada uno de los fungicidas y se vaciaron en cajas Petri y se dejó solidificar por 24 horas. Posteriormente se colocó en el centro y por separado, un disco agar (8 mm de diámetro) que contenía micelio de cada uno de los cinco aislados del patógeno. El testigo, fue cada aislado en medio de cultivo PDA sin fungicida. Se utilizó cinco cajas por fungicida.

Sensitivity of *E. perseae* isolates to different fungicides *in vitro*. Five chemical fungicides and four products approved for use in orchards following organic practices were employed in the study. The chemical fungicides consisted of Azoxystrobin 25SC (0.4 mL formulated product per liter of water), Thiabendazole 60WP (0.6 grams formulated product per liter), Pyraclostrobin 25CE (1.0 mL formulated product per liter), Cyprodinil+Fludioxonil 62.5WG (1.0 gram formulated product per liter), and Azoxystrobin+Propiconazole 20SE (0.4 mL formulated product per liter). On the other hand, the organic management products were Copper sulfate (1.0 gram formulated product per liter), Copper gluconate (2.0 mL formulated product per liter), Copper oxychloride (1.0 gram formulated product per liter), and *Larrea tridentata* extract (2.0 mL formulated product per liter). These fungicides and products were tested against the five different *E. perseae* isolates. Each compound was applied at its recommended dose as a formulated product. A control group without any fungicide was also included for comparison. The research was organized using a completely randomized design. Each fungicide-fungus combination, along with the control, was replicated five times. In this experimental setup, one Petri dish was used as one replication.

PDA culture medium was utilized for the bioassay. After sterilizing the PDA, it was maintained at a temperature of 50 °C in Erlenmeyer flasks. The designated amount of each fungicide was then introduced into each flask. The mixture was subsequently poured into Petri dishes and allowed to solidify over a 24-hour period. Following this, a round agar disc with a diameter of 8 mm, containing mycelium from each of the five pathogen isolates, was individually placed at the center of the dishes. The control group consisted of each isolate grown

El ensayo se mantuvo en una incubadora a 24 °C y 80% de humedad relativa en completa oscuridad. Después del inicio del experimento, cada semana se midió con un vernier el diámetro de crecimiento de cada uno de los aislamientos de *E. perseae*. Para los fungicidas autorizados para huertos con manejo orgánico (sulfato de cobre, gluconato de cobre, oxiclórico de cobre y el extracto vegetal *Larrea tridentata*) se tomaron mediciones durante un mes, para los fungicidas químicos (azoxystrobin, tiabendazol, pyraclostrobin, cyprodinil+fludioxonil y azoxystrobin + propiconazol) por tres meses, esto debido a la vida media de los productos orgánicos que son de 15 a 20 días máximo y los químicos pueden llegar hasta 90 o 120 días, además, por el lento crecimiento de *E. perseae*, el cual puede tardar hasta un año en llenar la caja Petri. El porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PIM) se obtuvo de acuerdo con la fórmula de Pandey *et al.* (1982).

$$PIM = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

Donde dc = diámetro de la colonia del testigo, dt = diámetro de los tratamientos. Los datos de PIM se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Se utilizó el programa JMP de SAS Institute.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los aislamientos de *E. perseae* evaluados produjeron manchas pequeñas de color púrpura que conforme avanzó la enfermedad, las manchas fueron más grandes y coalescieron formando corchosis a los 150 días. Estos síntomas se asociaron a la enfermedad de mancha púrpura o roña del aguacate en los

on PDA without any fungicide. In total, five dishes were prepared for each fungicide.

The experiment was conducted under conditions of 24 °C temperature and 80% relative humidity. Darkness was maintained throughout the duration of the assay. As the experiment commenced, the diameter of growth for each *E. perseae* isolate was measured weekly using a vernier caliper. For the fungicides approved for use in organic orchards (copper sulfate, copper gluconate, copper oxychloride, and *Larrea tridentata* extract), measurements were taken for a span of one month. In contrast, measurements for the chemical fungicides (azoxystrobin, thiabendazole, pyraclostrobin, cyprodinil+fludioxonil, and azoxystrobin + propiconazole) extended over a period of three months. This difference was due to the relatively shorter half-life of organic products (15-20 days) compared to chemicals (90-120 days). Moreover, the sluggish growth of *E. perseae*, which could take up to a year to fill a Petri dish, necessitated an extended observation period. The calculation of the Mycelial Growth Inhibition Percentage (MIP) was performed using the formula established by Pandey *et al.* (1982).

$$MIP = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

Where *dc* = diameter of the control colony, *dt* = diameter of the treatments. MIP data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means were compared with Tukey's test ($P < 0.05$). The JMP program of SAS Institute was used.

RESULTS AND DISCUSSION

All the tested isolates of *E. perseae* exhibited the development of small purple spots. As the disease advanced, these spots grew in size and eventually

frutos (Figura 1). Los síntomas observados coincidieron con los descritos por Everett *et al.* (2011), Fan *et al.* (2017) y Morales (2017; 2022).

La variedad Flor de María fue la primera en presentar síntomas con un promedio aproximado de 41 días. Mientras que, Méndez presentó síntomas a los 91 días. Esta variedad también presentó mayor número y tamaño de manchas, con un promedio de 7-8 manchas y un tamaño promedio de 3 mm; y en el caso de la variedad Méndez presentó un promedio de 2-3 manchas y un tamaño promedio de 2 mm, esto al mes de haberse observado la presencia de síntomas (Figura 2).

De acuerdo con los parámetros evaluados, se observa la susceptibilidad variedad Flor de María con respecto a la variedad Méndez, lo que concuerda con lo expuesto por Morales (2022), quien reportó que en distintas variedades de aguacate inoculadas con *E. perseae*, la variedad Flor de María fue más susceptible, presentando síntomas más severos. Al contrario de lo que menciona Morales (2017) quien dio a conocer que existe una notable preferencia de *E. perseae* por atacar con mayor incidencia y severidad en campo al cultivar Méndez. Sin embargo, en campo se observa mayor superficie sembrada de variedad Méndez que de Flor de María, por lo cual es que no se ha detectado la susceptibilidad de esta variedad a dicha enfermedad.

Con respecto al grado de virulencia de los aislados de cada una de las áreas agroecológicas, se pudo observar que la variedad Flor de María, los frutos inoculados con los aislados de Cerro Colorado (ECC) de 1200-1420 m.s.n.m. y Canacuas (ECA) de 2081-2300 m.s.n.m., fueron los primeros en presentar síntomas a los 33 días, mientras en número de manchas fue estadísticamente significativo el aislado ECC con 15 manchas. En cuanto al tamaño de las manchas no hubo diferencias significativas (Figura 3).

En los aislados de Zacandaro (EZA) y Canacuas (ECA) fueron los primeros en mostrar síntomas en

merged together, resulting in the formation of corkosis within 150 days. These visual indications were linked to the occurrence of avocado purple blotch disease, as depicted in Figure 1. The observed symptoms aligned closely with the descriptions

la variedad Méndez a los 87 días. En cuanto al número de manchas, con el aislado EZA presentaron el mayor número de manchas en los frutos; mientras que, el tamaño de manchas no presentó diferencias significativas (Figura 4). El aislado ECC



Figure 1. Symptoms of purple blotch on avocado fruit produced in pathogenicity tests by isolates of *E. perseae*, on Flor de María (top) and Méndez (down) varieties. A) ECC (1,200-1,420 m.a.s.l.), B) EZU (1,421-1,640 m.a.s.l.), C) EZA (1,641-1,860 m.a.s.l.), D) EAR (1,861-2,080 m.a.s.l.), E) ECA (2,081- 2,300 m.a.s.l.).

Figura 1. Síntomas de mancha púrpura=roña en frutos de aguacate producidos en las pruebas de patogenicidad por los aislados de *E. perseae*, en variedad Flor de María (superior) y Méndez (inferior). A) ECC (1,200-1,420 m.s.n.m.), B) EZU (1,421-1,640 m.s.n.m.), C) EZA (1,641-1,860 m.s.n.m.), D) EAR (1,861-2,080 m.s.n.m.), E) ECA (2,081-2,300 m.s.n.m.).

provided by Everett *et al.* (2011), Fan *et al.* (2017), and Morales (2017; 2022).

Symptoms appeared on the Flor de María variety first, at an average of around 41 days. The Méndez variety exhibited symptoms after 91 days. Furthermore, the Flor de María variety displayed a larger number and size of spots, averaging 7-8 spots with an average size of 3 mm. In contrast, the Méndez variety exhibited an average of 2-3 spots with an average size of 2 mm. These observations

mostró el mayor grado de virulencia en la variedad Flor de María y el aislado EZA en variedad Méndez de acuerdo con los parámetros evaluados, seguidos del aislado ECA en ambas variedades.

El área agroecológica de donde provenían los aislados de *E. perseae* pudo influir en su virulencia, ya que hubo diferencia estadística significativa con respecto a la presencia de síntomas y número de manchas. De acuerdo con López (2006) se encontró que en aislados de *Histoplasma capsulatum* provenientes de

were made one month after the initial symptom manifestation (Figure 2).

Based on the assessed parameters, a notable difference in susceptibility between the Flor de María and Méndez varieties is evident. This observation aligns with the findings of Morales (2022), who noted that among different avocado varieties inoculated with *E. perseae*, the Flor de María variety exhibited higher susceptibility and more pronounced symptoms. This contrasts with Morales' (2017) report, which suggested a clear inclination of *E. perseae* to target the Méndez cultivar with greater frequency and severity in field conditions.

However, it's important to consider that the Méndez variety holds a larger share of cultivation in the field compared to the Flor de María variety. This greater prevalence might explain why the susceptibility of the Flor de María variety to this disease hasn't been as noticeable.

In terms of the virulence level of isolates from different agroecological regions, notable findings were observed. For the Flor de María variety, the fruits inoculated with isolates from Cerro Colorado

diversas regiones geográficas presentaron diferencias en virulencia, esto debido a que un organismo se encuentra en diferentes condiciones ambientales, por lo que puede cambiar su comportamiento (incidencia y severidad) de acuerdo con la condición en que se encuentren.

Productos autorizados para su uso en huertos con manejo orgánico. Todos los productos evaluados perdieron efecto con el paso del tiempo. Sin embargo *L. tridentata* y oxiclورو de cobre desde la primera semana mostraron el mayor porcentaje de inhibición de micelio de 58%. Mientras que el gluconato de cobre mostró muy baja inhibición del micelio desde la primera semana con un 22% (Cuadro 1).

De acuerdo con IRET (2022), la vida media de un fungicida es el tiempo requerido (en días) para convertir el 50% de éste en otra(s) sustancia(s), en cualquiera de las matrices o compartimentos ambientales (agua, aire, suelo, biota) y según TECAGR (2013), los productos orgánicos pierden efecto entre 1 y 7 días, aunque depende de la formulación del producto y condiciones ambientales.

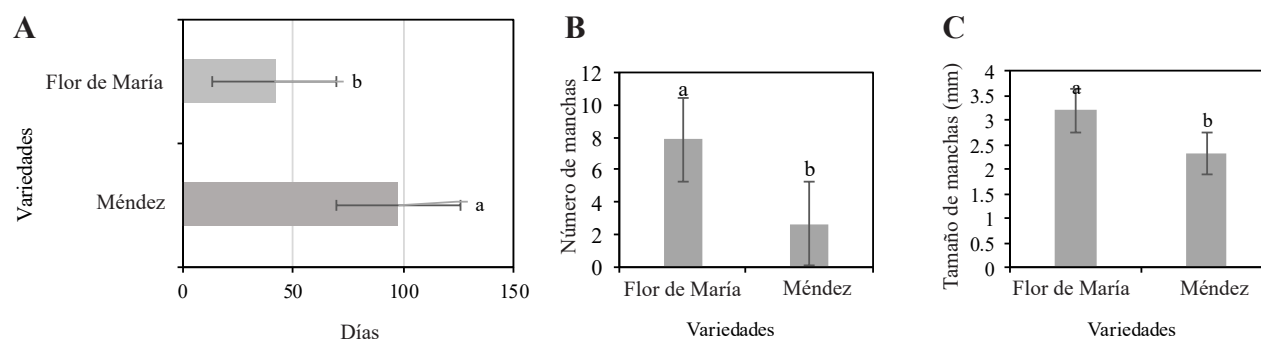


Figure 2. Comparison of Flor de María and Méndez varieties. A) Degree of damage, B) Presence of symptoms (days), C) number of spots and D) size of spots of cultivars Flor de María and Méndez. Mean values \pm standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Figura 2. Comparación de dos variedades de aguacate de Flor de María y Méndez. A) Grado de daño, B) Presencia de síntomas (días), C) en número de manchas y D) tamaño de manchas de los cultivares flor de María y Méndez. Valores promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

(ECC) ranging from 1200 to 1420 meters above sea level and Canacuas (ECA) ranging from 2081 to 2300 meters above sea level, displayed symptoms earliest at 33 days. Among these isolates, the ECC strain stood out with a statistically significant count of 15 spots. However, there were no noteworthy variations in the size of the spots (Figure 3).

El efecto que mantuvo *L. tridentata* sobre los aislados de *E. perseae* inhibiendo el 58% del micelio del hongo (Cuadro 1), puede deberse a que este extracto contiene ácido nordihidroguaiaietico que según Arteaga *et al.* (2005), Gowan (2022), Vargas *et al.* (2006) y Lira (2003) tiene un alto potencial para el control de hongos productores de aflatoxi-

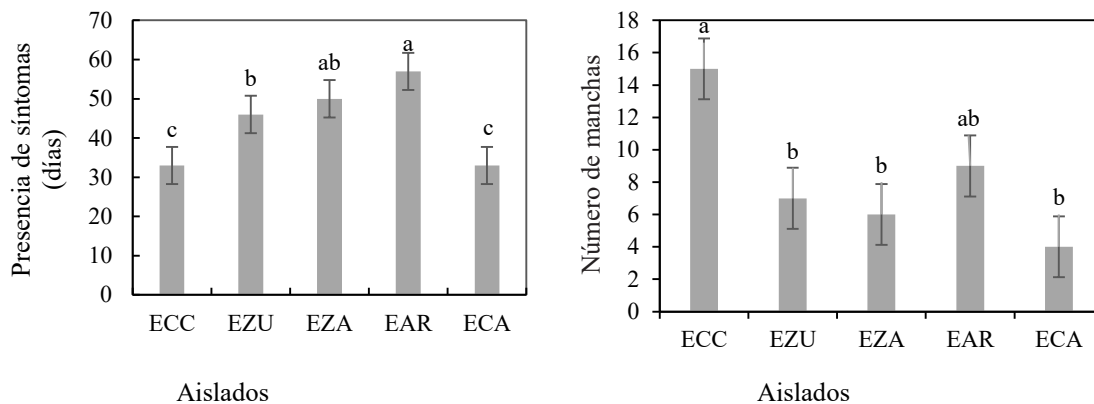


Figure 3. Comparison of presence of symptoms and number of spots of isolates from each agroecological area on Flor de María variety. Mean values \pm standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Figura 3. Comparación de presencia de síntomas y número de manchas de los aislados de cada área agroecológica en variedad Flor de María. Valores promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Symptoms emerged on the Méndez variety at 87 days, with the Zacandaro (EZA) and Canacuas (ECA) isolates exhibiting the earliest signs. In terms of the number of spots, it was the EZA isolate that displayed the greatest count on the fruit. Meanwhile, variations in the size of the spots were not statistically significant (Figure 4). Based on the assessed criteria, the ECC isolate demonstrated the highest level of virulence in the Flor de María variety, whereas the EZA isolate exhibited the greatest virulence in the Méndez variety. Subsequently, the ECA isolate displayed intermediate virulence levels in both varieties.

nas. En este sentido *E. perseae* se caracteriza por producir elsinocromos que según Daub y Chung (2009) es un tipo de toxina similares a las del género *Aspergillus*.

El oxiclورو de cobre tuvo mayor inhibición (57.5%) de micelio de los aislados evaluados en comparación con los otros compuestos que contenían cobre. El sulfato de cobre presentó una inhibición de 42% y gluconato de cobre 21.8% (Cuadro 1). Esto puede deberse a la concentración que posee este producto (35-70% de cobre metálico) (Adama, 2021) y por su alto potencial de ionización al tener más cantidad de ion Cu^{2+} , que es la parte que tie-

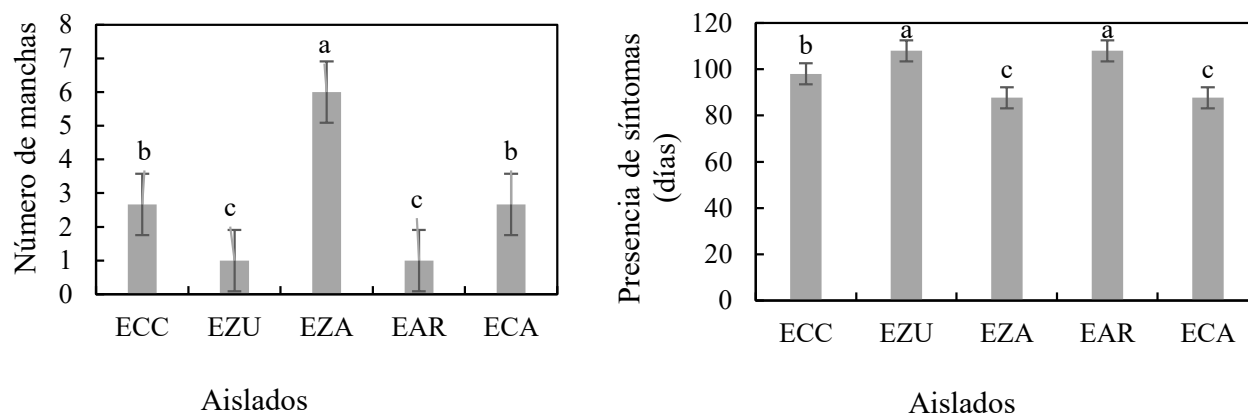


Figure 4. Comparison of presence of symptoms and number of spots of isolates from each agroecological area in Méndez variety. Mean values \pm standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Figura 4. Comparación de presencia de síntomas y número de manchas de los aislados de cada área agroecológica en variedad Méndez. Valores promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

The origin of *E. perseae* isolates from distinct agroecological areas appears to have exerted an influence on their virulence. This inference is supported by a statistically significant disparity observed in the manifestation of symptoms and the count of spots. López (2006) documented variations in the virulence of *Histoplasma capsulatum* isolates across diverse geographic regions. This phenomenon can be attributed to the organism's adaptation to distinct environmental circumstances, leading to variations in its behavior, including incidence and severity, based on the prevailing conditions.

Products authorized for use in organically managed orchards. All the products evaluated lost effect with the passage of time. However, *L. tridentata* and copper oxychloride showed the highest mycelium inhibition percentage of 58% from the first week. While copper gluconate showed very low mycelial inhibition from the first week with 22% (Table 1).

ne la acción fungicida e inhibe la germinación de las esporas (TECAGR, 2013), más que el sulfato de Cu (25%) y gluconato de Cu (<9%) (Adama, 2021). Además, la solubilidad de oxicluro de cobre es más baja, esto significa que el cobre se libera más lentamente, por lo tanto, actúa por más tiempo (TECAGR, 2013). El cobre actúa sobre seis diferentes estructuras y/o procesos de la célula del hongo: núcleo, ribosoma, mitocondria, retículo endoplasmático liso y rugoso, membrana plasmática y cromatina, lo que uede favorecer la eficiencia (Adama, 2021).

La baja inhibición que tuvo el gluconato de cobre *in vitro* del 21.8% de inhibición sobre los aislamientos de *E. perseae* (Cuadro 1), se podría deber a que este producto interactúa con la planta ya que fue diseñado específicamente para mejorar la asimilación del cobre en el interior de la planta (ATEEC, 2022). Como argumentan Kirkby y Römheld (2007) el cobre ayuda a la planta en la fotosíntesis, respiración y desintoxicación de radicales superóxidos y también a la producción de

Table 1. Percent mycelial inhibition of *E. perseae* isolates with organic products at different post-inoculation times on avocado fruit.

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de micelio de aislamientos de *E. perseae* con productos orgánicos en diferentes tiempos post-inoculación en frutos de aguacate.

| Tratamientos | Inhibición del crecimiento del micelio (%) | | |
|----------------------|--|---------|---------|
| | 7 días | 15 días | 30 días |
| <i>L. tridentata</i> | 79.40a ^z | 56.23a | 58.10a |
| Oxícloruro de cobre | 66.55a | 48.46a | 57.50a |
| Sulfato de cobre | 65.89a | 46.90a | 42.80b |
| Gluconato de cobre | 30.35b | 23.21b | 21.80c |
| Testigo | 0c | 0c | 0d |

Values with different letters in the same column are significantly different ($p > 0.05$). / Valores con distinta letra, en la misma columna, son significativamente distintos ($p > 0.05$).

As outlined by IRET (2022), the average lifespan of a fungicide denotes the duration (measured in days) required for the conversion of 50% of the substance into other forms within various environmental components (namely water, air, soil, and biota). Additionally, TECAGR (2013) points out that the effectiveness of organic products diminishes within a span of 1 to 7 days. Nevertheless, the extent of this decline hinges on the product's formulation and prevailing environmental conditions.

The observed impact of *L. tridentata* on *E. perseae* isolates, leading to a 58% inhibition of fungal mycelium (as shown in Table 1), might be attributed to the presence of nordihydroguaiaretic acid within the extract. This notion finds support in the findings of Arteaga *et al.* (2005), Gowan (2022), Vargas *et al.* (2006), and Lira (2003), who attest to the compound's potential for curbing aflatoxin-producing fungi. In line with this, *E. perseae* is known for its synochrome production—a type of toxin akin to those originating from the *Aspergillus* genus—according to the insights of Daub and Chung (2009).

Copper oxychloride exhibited a higher level of inhibition (57.5%) against the mycelium of the tested

fitoalexinas que inhiben la germinación de esporas y el crecimiento de hongos y ligninas que forman una barrera mecánica como resistencia de la planta a enfermedades, por lo cual sería interesante probar su eficacia en campo.

Cada aislado evaluado de las diferentes áreas agroecológicas, presentó diferentes grados de sensibilidad, similar con lo reportado por Espinoza *et al.* (2017) que al evaluar la sensibilidad de 60 aislamientos *Colletotrichum acutatum* a los fungicidas tiofanato-metilo y azoxistrobina de dos regiones productoras de fresa, la dosis efectiva media DE_{50} de tiofanatometil varió de 0.3 a 9.7 mL L⁻¹ en el Valle de Maravatío ubicada a 2032 m.s.n.m. y de 1.4 a 3.0 mL L⁻¹ en el Valle de Zamora (a 1580 m.s.n.m) y para azoxistrobina varió de 0.04 a 0.36 mL L⁻¹ en Maravatío y de 0.07 a 0.99 mL L⁻¹ en Zamora, mostrando así diferentes grados de sensibilidad en cada zona.

Por otro lado, de acuerdo con Fuentes *et al.* (2014) las melaninas que producen los hongos pueden protegerlos de algunos productos antimicóticos, en el caso de *E. perseae* produce elsinocromos a partir del segundo mes.

El tratamiento con *L. tridentata* presentó el mayor porcentaje de inhibición (74%) en los ais-

isolates compared to the other copper-containing compounds. Copper sulfate displayed an inhibition rate of 42%, while copper gluconate exhibited 21.8% inhibition (Table 1). This difference in inhibition could be attributed to the concentration of copper oxychloride, which contains 35-70% metallic copper (Adama, 2021), and its higher ionization potential, resulting in a greater presence of Cu^{2+} ions. These ions are responsible for the fungicidal action and the inhibition of spore germination (TECAGR, 2013), surpassing the effects of copper sulfate (25%) and copper gluconate (<9%) (Adama, 2021). Furthermore, the lower solubility of copper oxychloride causes a slower release of copper ions, leading to a prolonged and sustained effect (TECAGR, 2013). Copper demonstrates its impact on six distinct structures or processes within the fungal cell: the nucleus, ribosome, mitochondrion, smooth and rough endoplasmic reticulum, plasma membrane, and chromatin. This multifaceted approach contributes to its enhanced efficiency (Adama, 2021).

The relatively low *in vitro* inhibition rate of copper gluconate at 21.8% against *E. perseeae* isolates (Table 1) might be attributed to its distinct interaction with the plant, as it was specifically formulated to enhance copper assimilation within plants (ATEEC, 2022). Kirkby and Römheld (2007) have pointed out that copper contributes to various plant processes, including photosynthesis, respiration, and the detoxification of superoxide radicals. Additionally, copper aids in the synthesis of phytoalexins that impede spore germination and fungal growth, as well as the formation of lignins that establish a physical barrier, bolstering plant resistance against diseases. Given these roles, evaluating its effectiveness in field conditions would be a worthwhile endeavor.

Each evaluated isolate from the various agroecological regions displayed distinct levels

lados de Zumpimito (EZU) y Canacuas (ECA) con 75% de inhibición, siendo el aislado de Zacandaro (EZA) donde tuvo menor efecto 34%. Oxícloruro de cobre en el aislado EZU logró un mejor control sobre el crecimiento con un 72% de inhibición, con diferencias significativas sobre el resto de los aislados. El sulfato de cobre tuvo la mayor inhibición del 60% en el aislado ECC, y en el aislado EAR registró menor efecto de inhibición (27%). Por otra parte, con el tratamiento de gluconato de cobre no existió diferencias significativas en el crecimiento del micelio de los aislamientos evaluados de las áreas agroecológicas (Cuadro 2).

Productos químicos. Los bioensayos con productos químicos se midieron tres meses en los cuales el primer mes todos los productos inhibieron por completo el crecimiento del micelio. En el segundo mes azoxistrobin+propiconazol, tiabendazol y azoxystrobin, no se observaron crecimiento micelial, por lo que se inhibió el crecimiento del micelio en un 100%, comparado con el testigo que creció 3 cm de diámetro. Cyprodinil + fludioxonil y pyraclostrobin perdieron efecto en el segundo mes de evaluación de los aislados mostrando un porcentaje de inhibición del 93%. Esto podría deberse al tiempo de eficiencia del producto por el tiempo de degradación que, de acuerdo con Syngenta (2022), para cyprodinil + fludioxonil es de 10 a 30 días, para pyraclostrobin de 2 a 36 días y para azoxystrobin es de 17 a 30 días, mientras que para propiconazol es de hasta 85 días y tiabendazol hasta de 120 días. Aunque según NPIC (2022) se ha encontrado una amplia variedad de vidas medias para el mismo fungicida bajo diferentes condiciones ambientales.

En el tercer mes los productos azoxistrobin+propiconazol y tiabendazol continuaron inhibiendo el crecimiento del micelio en un 100%, mientras que cyprodinil+fludioxonil y pyraclostrobin inhibieron 87.5 y 86.3%, respectivamente

of sensitivity, mirroring findings by Espinoza *et al.* (2017). When examining the sensitivity of 60 *Colletotrichum acutatum* isolates to fungicides thiophanate-methyl and azoxystrobin in two strawberry-producing regions, these researchers found notable variations. In the Maravatío Valley, situated at 2032 meters above sea level, the mean effective dose (DE_{50}) of thiophanate-methyl ranged from 0.3 to 9.7 mL L⁻¹, while in the Zamora Valley (at 1580 meters above sea level) it spanned from 1.4 to 3.0 mL L⁻¹. For azoxystrobin, the range was 0.04 to 0.36 mL L⁻¹ in Maravatío and 0.07 to 0.99 mL L⁻¹ in Zamora. This underscores the distinct sensitivity levels across different regions.

Conversely, as outlined by Fuentes *et al.* (2014), fungi-generated melanins can offer protection against certain antifungal agents. In the case of *E. perseae*, it produces elsinocromos starting from the second month.

Treatment with *L. tridentata* exhibited the most pronounced inhibitory effect, registering a 74% growth reduction in the Zumpimito (EZU) isolate and 75% in the Canacuas (ECA) isolate. Conversely, the Zacandaro (EZA) isolate demonstrated a relatively milder impact, resulting in a 34% growth reduction. In the case of the EZU isolate, copper oxychloride showcased robust growth control, achieving a 72% inhibition rate that significantly outperformed the other isolates. Among them, copper sulfate demonstrated the highest inhibition rate at 60%, specifically in the ECC isolate. However, its inhibitory effect was least pronounced in the EAR isolate, registering a 27% reduction in growth. Conversely, when applying copper gluconate treatment, no notable distinctions in mycelial growth emerged among the evaluated isolates from the agroecological regions (Table 2).

y fue estadísticamente significativo comparado con azoxistrobin+propiconazol y tiabendazol. Aunque azoxystrobin perdió efecto inhibiendo solo el 93.3% no fue estadísticamente significativo con respecto a azoxistrobin+propiconazol y tiabendazol. Todos los productos tuvieron un porcentaje de inhibición de micelio significativo comparado con el testigo (Cuadro 3).

Con cyprodinil+fludioxonil y pyraclostrobin se presentaron diferencias significativas a los 60 y 90 días al presentar distintos porcentajes de inhibición de micelio en los aislamientos de las diferentes áreas agroecológica, resultando ser unos más sensibles que otros (Cuadro 4). Se observó menor susceptibilidad a estos productos del aislado ECA del 67%.

CONCLUSIONES

Los cinco aislados de *E. perseae* de cada área agroecológica presentaron diferentes grados de virulencia en frutos de aguacate. Las plantas de vivero inoculadas en la variedad Flor de María, mostraron mayor susceptibilidad al patógeno bajo los parámetros evaluados (número de manchas, tamaño de manchas y días en los que se presentaron los síntomas). Los aislados de *E. perseae* de las diferentes áreas agroecológicas mostraron diferentes valores de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas evaluados (*Larrea tridentata*, Oxicloruro de cobre, sulfato de cobre, cyprodinil+fludioxonil y pyraclostrobin). *Larrea tridentata* y el oxicloruro de cobre inhibieron el 74.1 y 72.4% con el aislado EZU (1421-1640 m.s.n.m.), siendo los mejores productos comparado con gluconato de cobre al controlar un máximo de 37.7% de inhibición. El hongo presentó mayor sensibilidad *in vitro* (100%) a los fungicidas químicos:

Table 2. Percent mycelial inhibition of *E. perseae* isolates from different agroecological areas with fungicides at different post-inoculation times on avocado fruit.**Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de micelio de aislamientos de *E. perseae* de diferentes áreas agroecológicas con fungicidas a diferentes tiempos de post-inoculación en frutos de aguacate.**

| Tratamientos | Días | Inhibición del crecimiento del micelio (%) | | | | |
|----------------------|------|--|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | | ECC
(1,200-1,420
m.s.n.m.) | EZU
(1421-1640
m.s.n.m.) | EZA
(1641- 1860
m.s.n.m.) | EAR
(1861- 2080
m.s.n.m.) | ECA
(2081-2300
m.s.n.m.) |
| <i>L. tridentata</i> | 7 | 62.53b | 78.95ab | 60.15b | 63.49b | 87.93a |
| | 15 | 44.82b | 70.00a | 45.00b | 51.35b | 70.00a |
| | 30 | 57.37b | 74.13a | 34.04 c | 50.00b | 75.00a |
| Oxicloruro de cobre | 7 | 47.31b | 69.98ab | 58.93ab | 70.39ab | 86.13a |
| | 15 | 33.33b | 52.00ab | 40.00b | 45.94ab | 64.00a |
| | 30 | 57.37b | 72.41a | 48.93 b | 53.84 b | 55.00b |
| Sulfato de cobre | 7 | 76.67ab | 72.67ab | 55.24ab | 41.40b | 83.44a |
| | 15 | 54.02a | 54.00a | 23.08bc | 16.13c | 62.00a |
| | 30 | 60.65 a | 32.75bc | 37.5ab | 27.02b | 51.66 ab |
| Gluconato de cobre | 7 | 44.04ab | 8.075b | 47.88a | 31.46ab | 34.99ab |
| | 15 | 31.03 ab | 6.00b | 32.50 a | 20.54 ab | 27.50ab |
| | 30 | 37.70a | 8.27a | 23.40a | 26.15a | 21.66a |

Values with different letters in the same row are significantly different ($P > 0.05$). / Valores con distinta letra, en la misma fila, son significativamente distintos ($P > 0.05$).

Chemical products. The bioassays involving chemical agents were conducted over a span of three months. During the initial month, all products managed to completely inhibit the growth of mycelium. Moving into the second month, azoxystrobin+propiconazole, thiabendazole, and azoxystrobin achieved a remarkable outcome: there was an absence of mycelial growth, thus resulting in a 100% inhibition rate. In contrast, the control group exhibited a growth of 3 cm in diameter. Both cyprodinil + fludioxonil and pyraclostrobin displayed a decline in effectiveness during the second month of isolate evaluation, registering an inhibition rate of 93%. This trend might stem from the efficacy duration of the product, linked to its degradation timeline. According to Syngenta (2022), cyprodinil + fludioxonil remains effective for a period ranging from 10 to 30 days, pyraclostrobin from 2 to 36 days, and azoxystrobin

thiabendazol y azoxystrobin + propiconazol y a los autorizados en huertos con manejo orgánico: *L. tridentata* y oxicloruro de cobre un 58%.

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

from 17 to 30 days. In contrast, propiconazole sustains its efficacy for up to 85 days, while thiabendazole remains effective for as long as 120 days. However, it's noteworthy, as stated by NPIC (2022), that fungicides may exhibit diverse half-lives under varying environmental conditions.

During the third month, the effectiveness of azoxystrobin+propiconazole and thiabendazole

products persisted at a 100% inhibition rate against mycelial growth. In contrast, cyprodinil+fludioxonil and pyraclostrobin achieved slightly lower inhibitions, at 87.5 and 86.3% respectively. These reductions were statistically significant when compared to the inhibitions achieved by azoxystrobin+propiconazole and thiabendazole. Notably, azoxystrobin's efficacy declined, resulting in a 93.3% inhibition rate, which, although lower, was not statistically distinct from azoxystrobin+propiconazole and thiabendazole. It's worth highlighting that all tested products exhibited a significant level of mycelium inhibition when compared to the control group (Table 3).

With cyprodinil+fludioxonil and pyraclostrobin, significant differences were observed at 60 and 90 days, with different percentages of mycelium inhibition in the isolates from the different agroecological areas, some being more sensitive than others (Table 4). A lower susceptibility to these products was observed for the 67% ECA isolate.

## CONCLUSIONS

The five *E. perseae* isolates from each agroecological area exhibited varying virulence levels on avocado fruit. Nursery plants with the Flor de María variety were more susceptible to the pathogen based on spot count, spot size, and symptom appearance time. *E. perseae* isolates from different agroecological areas showed varying *in vitro* sensitivity to tested fungicides (*Larrea tridentata*, copper oxychloride, copper sulfate, cyprodinil+fludioxonil, and pyraclostrobin). *Larrea tridentata* and copper oxychloride achieved 74.1% and 72.4% inhibition, respectively, against the EZU isolate (1421-1640 m.a.s.l.), outperforming copper gluconate, which controlled a maximum of 37.7% inhibition. The fungus displayed higher *in vitro* sensitivity (100%) to chemical fungicides thiabendazole and azoxystrobin + propiconazole, as well as to orchard-approved organic options: *Larrea tridentata* and copper oxychloride (58%).

**Table 3. Percent mycelium inhibition of *E. perseae* isolates with chemicals over different evaluation times.**

**Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de micelio de aislamientos de *E. perseae* con productos químicos en diferentes tiempos de evaluación.**

| Tratamientos              | Inhibición del crecimiento del micelio (%) |         |         |
|---------------------------|--------------------------------------------|---------|---------|
|                           | 30 días                                    | 60 días | 90 días |
| Tiabendazol               | 100a                                       | 100a    | 100a    |
| Azoxystrobin+propiconazol | 100a                                       | 100a    | 100a    |
| Cyprodinil+fludioxonil    | 100a                                       | 93.70b  | 87.52bc |
| Pyraclostrobin            | 100a                                       | 93.18b  | 86.35c  |
| Azoxystrobin              | 100a                                       | 100a    | 93.34ab |
| Testigo                   | 0b                                         | 0c      | 0d      |

Values with different letters in the same column are significantly different ( $p > 0.05$ ). / Valores con distinta letra, en la misma columna, son significativamente distintos ( $p > 0.05$ ).

**Table 4. Percentage mycelial inhibition of *E. perseae* isolates (from different agroecological areas) with different fungicides at different post-inoculation times.****Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de micelio de aislamientos de *E. perseae* (de diferentes áreas agroecológicas) con diferentes fungicidas en diferentes tiempos de post-inoculación.**

| Tratamientos                   | Días | Inhibición del crecimiento del micelio (%) |                                |                                 |                                 |                                |
|--------------------------------|------|--------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                                |      | ECC<br>(1,200-1,420<br>m.s.n.m.)           | EZU<br>(1421-1640<br>m.s.n.m.) | EZA<br>(1641- 1860<br>m.s.n.m.) | EAR<br>(1861- 2080<br>m.s.n.m.) | ECA<br>(2081-2300<br>m.s.n.m.) |
| Azoxystrobin                   | 30   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 60   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 90   | 99a                                        | 99.72a                         | 100a                            | 100a                            | 73.91b                         |
| Azoxystrobin +<br>propiconazol | 30   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 60   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 90   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
| Cyprodinil<br>+ fludioxonil    | 30   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 60   | 98.07a                                     | 98.57a                         | 92.72a                          | 92.5a                           | 86.66b                         |
|                                | 90   | 95a                                        | 98.33a                         | 92.5a                           | 90.5a                           | 67.53b                         |
| Pyraclostrobin                 | 30   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 60   | 95.55a                                     | 98.57a                         | 91.36ab                         | 81.66b                          | 98.78a                         |
|                                | 90   | 91.75a                                     | 95.55a                         | 92.08a                          | 86a                             | 66.37b                         |
| Tiabendazol                    | 30   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 60   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |
|                                | 90   | 100a                                       | 100a                           | 100a                            | 100a                            | 100a                           |

Values with different letters in the same row are significantly different ( $p > 0.05$ ). / Valores con distinta letra, en la misma fila, son significativamente distintos ( $p > 0.05$ ).

## CITED LITERATURE

- Adama, 2021. <https://www.adama.com/mexico/es>. Consultada en septiembre de 2022.
- Alfaro EE, Morales GJL, Pedraza SME, Chávez BAT y Morales MKL. 2017. Hongos asociados al síndrome de la roña del aguacate en el estado de Michoacán, México. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. 1: 114-125. [http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias\\_VCLA/2017/Memorias\\_VCLA\\_2017\\_PG\\_181.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_181.pdf).
- Arteaga S, Andrade CA, Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic. *Ethnopharmacol.* 3: 98. 10.1016/j.jep.2005.02.002.
- ATEEC (Antes todo esto era campo), 2022. Cómo utilizar gluconato de cobre en agricultura. <https://www.antestodoestoeracampo.net/gluconato-de-cobre/>. Consulta en septiembre 2022
- CEDRSSA (Centro de estudios para el desarrollo rural sustentable y la soberanía alimentaria) (2017) reporte caso de exportación: el aguacate palacio legislativo de San Lázaro. <http://www.cedrssa.gob.mx>. (Consulta octubre de 2021)
- Chung, KR. 2011. *Elsinoë fawcettii* y *Elsinoë australis*: los patógenos fúngicos que causan la sarna de los cítricos. *Patología vegetal molecular.* 12: 123-135. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00663.x>
- Daub ME, Herrero S, Chung KR. 2007. Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. *Plant disease.* 38: 461-490. 10.1094/APSnetFeature/2007-0207
- Espinoza AD, Silva RHV, Leyva MSG, Marbán MN, Rebollar AÁ. 2017. Sensibilidad de aislados de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobin. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2: 34. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1612-4>
- Everett KR, Rees-George J, Pushparajah IPS, Manning MA y Fullerton RA. 2011. Molecular Identification of *Sphaceloma perseae* (Avocado Scab) and its Absence in

- New Zealand. Journal of Phytopathology, 2: 106-113. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01739.x>
- Fan XL, Barreto RW, Groenewald JZ, Bazerra JDP, Preira OL, Cheewangkoon R, Mostert L, Tian CM y Crous PW. 2017. Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoe* (Myrangiiales Dothideomycetes) 2: 1-20. 10.1016/j.simyco.2017.02.001.
- Gowan Mexicana S.A.P.I de C.V. 2022. Org fung, ficha técnica. [www.gowanmexicana.com](http://www.gowanmexicana.com). Consulta septiembre 2022
- Henson JM, Butler MJ, & Day AW. 1999. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. Annual review of phytopathology, 37: 447-471. 10.1146/annurev.phyto.37.1.447.
- IRET. Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas. 2022. Manual de Plaguicidas de Centroamérica. Destino ambiental. <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/destino-ambiental#:~:text=La%20vida%20media%20o%20DT,aire%2C%20suelo%2C%20biota>. Consulta septiembre de 2022.
- Jacobson ES. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. Clinical microbiology reviews, 13: 708-717. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.708>
- Kirkby EA and Römheld V. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. Proceedings 5: 43, The International Fertilizer Society, P.O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/MicronutrientesenlaFisiologia.pdf>
- Lira RH. 2003. Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. Revista Mexicana de Fitopatología, 21(2), 214-222. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221217>
- López CE. 2006. Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*. Revista Argentina de Microbiología: 1: 235-242. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016794012>
- Marroquín PFJ. 1999. Factores que favorecen la incidencia de roña (*Sphaceloma perseae* Jenkin.) en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) "Hass", en tres regiones agroclimáticas de Michoacán. México. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 309-312. [https://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4\\_p309.pdf](https://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p309.pdf)
- Morales GJL. 2017. Estado actual de las enfermedades del fruto del aguacate en México: roña y antracnosis. 1: 118-121. Disponible en: Nuestro mexico.com, <http://www.nuestro-mexico.com/Michoacan-de-Ocampo/Ziracuaretiro/Areas-de-menos-de-500-habitantes/El-Copal/> consultada el 13 de Diciembre del 2021.
- Morales GJL. 2022. Esclarecimiento del agente causal del anillamiento del pedúnculo y roña del aguacate. Memorias del 15° Congreso Nacional del sistema producto aguacate. Uruapan Michoacán México. [http://www.conapavirtual.com/MODULAREvista\\_conapa/modulos/web/www2](http://www.conapavirtual.com/MODULAREvista_conapa/modulos/web/www2).
- National Pesticide Information Center (NPIC). 2022. ¿Qué pasa con los pesticidas liberados en el medio ambiente? <http://npic.orst.edu/index.es.html>. Consulta septiembre 2022.
- Pandey D, Tripathi N, Tripathi R, Dixit S. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 1982; 89: 344-349. <https://www.jstor.org/stable/43214961>.
- Compean R. 2020. Propagación de plantas clonales de Aguacate, en vivero BlueDrop Nursery. <https://agronoticias.com.mx/2020/08/14/mexico-cuenta-con-el-primer-vivero-de-propagacion-clonal-de-plantas-de-aguacate/>. Consulta diciembre 2022.
- Syngenta, 2021. <https://www.syngenta.com.mx/> consultada en septiembre de 2021.
- TECAGR (Técnico agrícola), 2013. Tipos de cobres agrícolas. <https://www.tecnicoagricola.es/tipos-de-cobres-agricolas/#:~:text=Lo%20mejor%20es%20el%20OXICLORURO,la%20germinacion%20de%20la%20espora>. Consulta octubre 2022.

# Considerations about interference RNA for the control of fungal diseases in Mexican and Latin American agriculture

## Consideraciones sobre el ARN de interferencia para el control de enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas en México y América Latina

**Oswaldo Jhosimar Couoh-Dzul**, <sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida C.P. 97205, Yucatán, México; **Karla Gisel Carreón-Anguiano**<sup>1</sup>, **Oscar A. Moreno-Valenzuela**, <sup>2</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida C.P. 97205, Yucatán, México; **Blondy Canto-Canché**\*<sup>1</sup>,

\*Corresponding autor: cantocanche@cicy.mx.

Received: October 30, 2022.

Accepted: June 01, 2023.

Couoh-Dzul OJ, Carreón-Anguiano KG, Moreno-Valenzuela OA and Canto-Canché B. 2023. Considerations about interference RNA for the control of fungal diseases in Mexican and Latin American agriculture. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(3): 479-513.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-5>

First DOI publication: June 15, 2023.

Primera publicación DOI: 15 de Junio, 2023.

**Abstract.** The control of phytopathogens is key for food security. In the last decade, the use of interference RNA (iRNA) has been proposed as a technological tool for controlling diseases and pests in agriculture. Although different approaches have been described, such as the use of “Host-Induce Gene Silencing” (HIGS) and “Virus-Induce Gene Silencing” (VIGS), more recently a non-transgenic and environmentally friendly approach has emerged, called “Spray -Induce Gene Silencing”

**Resumen.** El control de fitopatógenos es fundamental para la seguridad alimentaria. En la última década se ha propuesto el uso de ARN de interferencia (iRNA) como herramienta tecnológica para el control de enfermedades y plagas agrícolas. Aunque se han descrito distintos enfoques como el uso de “Host-Induce Gene Silencing” (HIGS) y de “Virus-Induce Gene Silencing” (VIGS), más recientemente ha surgido un enfoque no transgénico y amigable con el ambiente, denominado “Spray-Induce Gene Silencing” (SIGS), que hace uso de cadenas dobles de ARN (dsRNA) “desnudos”. Esta revisión analiza trabajos recientes que hacen uso del dsRNA, en especial del SIGS, para el control de hongos fitopatógenos; se enfatizan aspectos de su eficacia, inocuidad en la salud humana y su estabilidad en el medio ambiente. Se enfocan también importantes problemas fitosanitarios en México y América Latina que podrían ser abordadas con el uso del SIGS. La conclusión de esta revisión es que SIGS es una tecnología con verdadero potencial para el control de hongos fitopatógenos en plantas

(SIGS), which uses double-stranded “naked” RNA (dsRNA). This review discusses recent reports on the use of dsRNA, especially SIGS, to control phytopathogenic fungi; emphasizing factors such as efficacy, safety in terms of human health and its stability in the environment. It also focuses on important phytosanitary problems in Mexico and Latin America that can be addressed with SIGS. This review concludes that SIGS technology has real potential to be used to control phytopathogenic fungi on plants in the field and on postharvest fruits. At the end, the critical tasks and the lines of research that must be carried out to promote the SIGS to make it a reality are considered.

**Key words:** Gene silencing, dsRNA, SIGS, plant pathogens

The constant growth of the population demands a guarantee for food production, making it a global challenge. It has been estimated that by 2050, food demand will have increased more than 50% (van Dijk *et al.*, 2021), with the added responsibility of increasing productivity without causing a further environmental impact. The challenge is even greater, because pests and diseases are serious and constant constraints on food security. In particular, phytopathogenic fungi cause approximately 30% of all losses in agricultural crops in the world (Savary *et al.*, 2019). Currently, the main control method is the use of chemical fungicides, which causes a strong pressure of selection on pathogens, favoring a greater genetic diversity and the appearance of more resistant strains in their populations, as well as problems in the environment and in human health (Brito *et al.*, 2020). This makes it increasingly urgent to protect crops without depending on chemical fungicides. One option that offers great opportunities is the use of interference RNA (iRNA), which is the subject of this study.

de campo y en frutos postcosecha. Al final se plantean las rutas críticas e investigaciones que deben abordarse para que eventualmente el uso de SIGS pueda concretarse.

**Palabras clave:** Silenciamiento génico, dsRNA, SIGS, patógenos vegetales

El constante crecimiento de la población demanda garantizar la producción de alimentos, convirtiéndose en un reto mundial. Se estima que para el 2050 la demanda de alimentos incrementa más del 50% (van Dijk *et al.*, 2021), con la responsabilidad además de incrementar la productividad sin provocar mayor impacto ambiental. El desafío es aún mayor, porque las plagas y enfermedades ponen en constante riesgo la seguridad alimentaria. En particular, los hongos fitopatógenos provocan aproximadamente 30% de pérdidas en los cultivos agrícolas en el mundo (Savary *et al.*, 2019). Actualmente el principal método de control es el uso intensivo de fungicidas químicos, ocasionando una fuerte presión de selección sobre los patógenos, favoreciendo mayor diversidad genética y la aparición de aislados más resistentes en sus poblaciones, así como problemas en el medio ambiente y salud humana (Brito *et al.*, 2020). Por estas razones, es cada vez más apremiante proteger los cultivos sin depender de fungicidas químicos. Una opción que ofrece grandes oportunidades es el uso del ARN de interferencia (iRNA), sobre lo cual se tratará la presente revisión.

El iRNA es un mecanismo conservado, presente en la mayoría de las células eucariotas, que se relaciona con la represión de la transcripción (regulación transcripcional de la expresión génica) y/o degradación del ARN mensajero (mRNA), o inhibición de la traducción (regulación post-transcripcional); también participa en la defensa de los organismos contra elementos extraños (García-Ruiz *et al.*,

Interference RNA is a conserved mechanism, present in most eukaryotic cells, and associated with the repression of the transcription (transcriptional regulation of the gene expression) and/or degradation of the messenger RNA (mRNA), or inhibition of the translation (post-transcriptional regulation). It also participates in the defense of organisms against foreign elements (Garcia-Ruiz *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2018). This mechanism, known as gene silencing, is triggered by double-stranded RNA (dsRNA), which can have the structure of a double strand or a hairpin structure (Figure 1). The small RNAs (sRNAs) that trigger the silencing can be divided into two large groups, depending on their origin: micro-RNAs (miRNA) and small interfering RNA (siRNA).

The miRNAs come from the transcription of the MIR genes; the initial transcript is called pri-miRNA and it forms a hairpin structure, recognized by a Dicer-like ribonuclease III (DCL), which cuts them into smaller structures called pre-miRNA. DCL cuts again on the pre-RNAs and the miRNAs are produced.

On the other hand, siRNAs are produced through the transcription of repeated sequences or of transposition elements, or through the replication in the genome of sequences of viral origin, or by the secondary amplification of dsRNA after the sRNA were cut by Dicer, or by hybridizations of complementary regions between two independent transcripts (that codify different proteins). The original dsRNAs, produced by either one of these paths, are processed by DCL in smaller fragments. Both sRNAs (miRNA and siRNA) are fragments of approximately 19-24 nucleotides (nt) in length, and are recruited by the protein Argonaut (AGO) and processes in the RNA-induced silencing complex (RISC). The RISC complex uses one of the strands in the sRNA to guide the specific degradation of the target mRNA, which sRNA is complementary with;

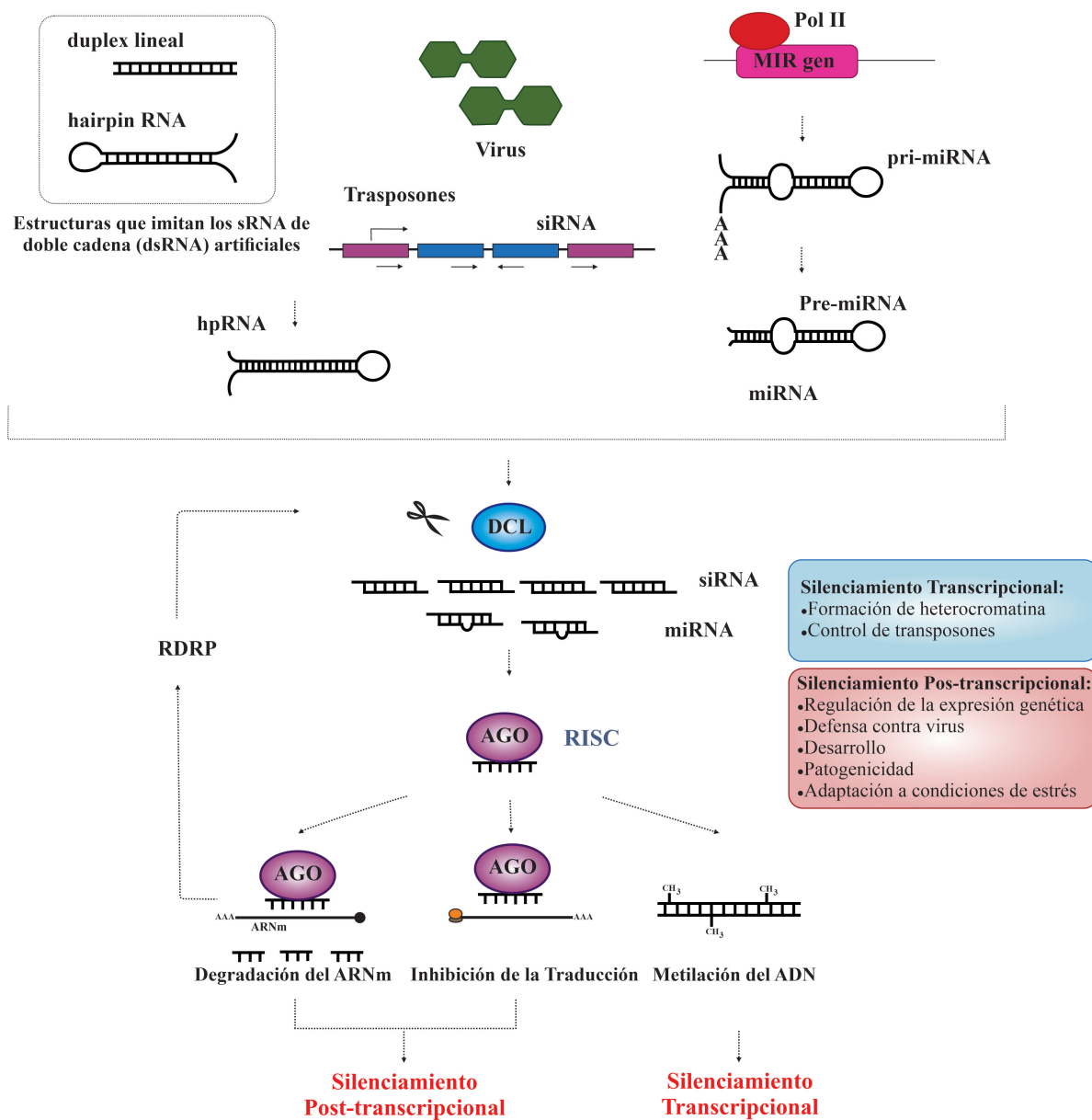
2016; Rosa *et al.*, 2018). Este mecanismo, conocido como silenciamiento génico, es desencadenado por estructuras de ARN de doble cadena (siglas en inglés dsRNA, por “double strand RNA”), que pueden tener una estructura de dúplex lineales o una estructura tipo “hairpin” (horquilla, también llamada estructura tallo-asa) (Figura 1). Los sRNAs (por “small RNA”, o ARN pequeños) que desencadenan el silenciamiento pueden dividirse en dos grandes grupos según su origen, los micro-ARNs (miRNA) y los pequeños ARN de interferencia (siRNA, de small interfering RNA).

Los miRNA provienen de la transcripción de los genes MIR; el transcrito inicial es llamado pri-miRNA y forma una estructura de horquilla que es reconocida por una ribonucleasa III tipo Dicer (DCL, por Dicer-like), que los corta a estructuras más pequeñas llamadas pre-miRNA. DCL hace un nuevo corte sobre los pre-RNA y se producen los miRNA.

Los siRNA por su parte, son producidos a través de la transcripción de secuencias repetidas o de elementos de transposición, o por la replicación en el genoma de secuencias de origen viral, o por la amplificación secundaria de dsRNA después de que los sRNA fueron cortados por Dicer, o por hibridaciones de regiones complementarias entre dos transcritos independientes (que codifican diferentes proteínas). Los dsRNA originales, producidos por cualquiera de estas vías, son procesados por DCL en fragmentos más pequeños.

Ambos sRNA (miRNA y siRNA), son fragmentos de aproximadamente 19-24 nucleótidos (nt), y son reclutados por la proteína Argonaut (AGO) y procesados en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por “RNA-induced silencing complex”). El complejo RISC usa una de las dos cadenas del sRNA para guiar la degradación específica del mRNA diana o blanco, con el cual el sRNA es complementario; de este modo el sistema regula

Mecanismos naturales de producción de sRNA





**Figure 1. Mechanisms of small RNA (sRNA) production in eukaryotes.** sRNAs comprise the small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA). On the left, the scheme shows the different biosynthetic pathways to produce siRNA, which may have structure of lineal-double strand DNA, or hairpin (stem-loop) structure. These two structures (lineal double strand DNA and hairpin) are those imitated by the artificial double strand sRNA (dsRNA), it means, those designed for biotechnology. On the right, the picture shows the biosynthesis of miRNA which come from MIR genes, which are transcribed to pri-RNA. Silencing starts when the pri-RNA or siRNA precursors are recognized and cut by DCL (Dicer protein), producing siRNA and pre-RNA respectively. The last one is cut again by DCL into miRNA. siRNA and miRNA bind AGO (Argonaut protein) becoming into RISC (RNA-induced silencing complex). In RISC, one siRNA or miRNA strand is used to guide transcriptional or post-transcriptional silencing. In fungi, iRNA regulates processes of development, defense, and pathogenicity on transcriptional and post-transcriptional levels.

**Figura 1. Mecanismos de producción de los ARN pequeños (sRNA) en eucariotas.** Los sRNA comprenden los pequeños ARN de interferencia (siRNA) y los micro ARNs (miRNA). En la izquierda se presentan las diferentes rutas de biosíntesis de los siRNA, los cuales pueden tener la forma estructural de doble cadena lineal o de hairpin (horquilla o tallo-asa). Estas dos estructuras (dúplex lineal y hairpin) son las estructuras que imitan los sRNA de doble cadena (dsRNA) artificiales, es decir, diseñados con fines biotecnológicos. A la derecha se observa la biosíntesis de los miRNA que provienen de los genes MIR, a partir de los cuales se transcriben los pri-RNA. El silenciamiento inicia cuando los pri-RNA o los precursores de los siRNA son reconocidos y cortados por DCL (proteína Dicer), generando los siRNA y los pre-miRNA respectivamente. Estos últimos son nuevamente cortados por DCL a miRNA. Los siRNA y miRNA posteriormente se unen a la proteína AGO (argonauta), formando el complejo RISC (por “RNA-induced silencing complex” o complejo de silenciamiento inducido por ARN). En RISC, una hebra del siRNA o del miRNA es usada para guiar el silenciamiento transcripcional o post transcripcional. En hongos el sistema de silenciamiento regula, tanto a nivel transcripcional como post transcripcional, procesos de desarrollo, defensa y patogenicidad.

in this way, the system regulates the expression of genes in a sequence-specific way. Figure 1 outlines the production and processing of both types of sRNAs: miRNA and siRNA.

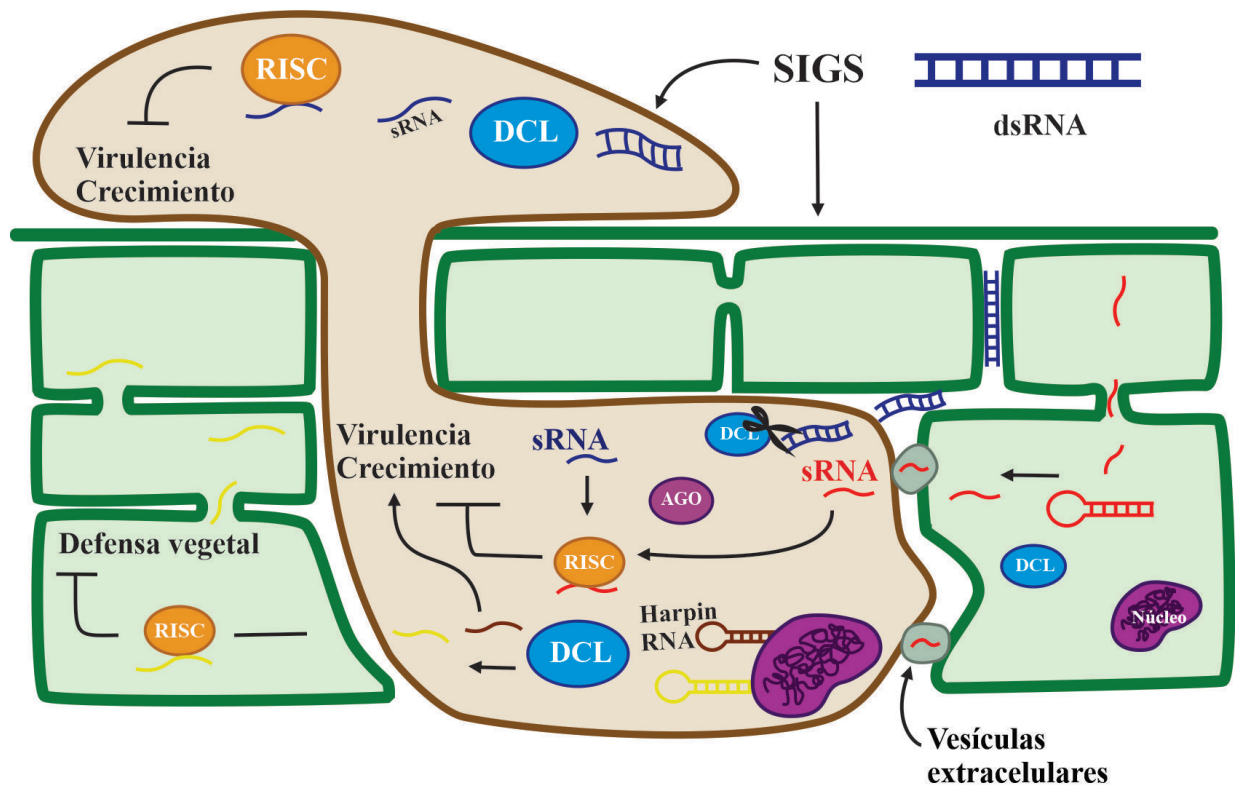
Plants have the natural ability to exchange sRNAs with their pathogens in a process called Crosskingdom iRNA, which plants can use to fight pathogens (Hudzik *et al.*, 2020) (Figure 2). In biotechnology there are three approaches to using iRNA to protect crops against pathogens and pests: 1) the expression of transgenes in the plant, or host-induced gene silencing (HIGS). This is a strategy to silence the genes of pathogens through the production *in vivo* of sRNA complementary to the sequences of the pathogen, using genetic engineering and the transformation with *Agrobacterium tumefaciens*, resulting in a plant that is a genetically modified organism, or GMO

la expresión de genes de una manera específica a la secuencia. La Figura 1 esquematiza la producción y procesamiento de ambos tipos de sRNAs: miRNA y siRNA.

Las plantas tienen la habilidad natural de intercambiar sRNAs con sus patógenos, en un proceso denominado “Crosskingdom iRNA” o intercambio cruzado entre reinos, con lo cual las plantas pueden combatir a los patógenos (Hudzik *et al.*, 2020) (Figura 2). En la biotecnología, existen tres enfoques para aprovechar el iRNA para proteger los cultivos: 1) la expresión de transgenes en la planta, llamado HIGS por “host-induced gene silencing” (silenciamiento génico por la producción de dsRNA por el hospedante). HIGS es una estrategia para silenciar los genes de los patógenos a través de la producción *in vivo* de sRNA complementarios a las secuencias del patógeno, mediante el uso de la

(Halder *et al.*, 2022; Ghag *et al.*, 2019; Koch and Wassenegeger, 2021). Most of the genes that have been targeted in fungi have been structural genes, development regulators and pathogenicity factors (Yin and Hulbert, 2015). 2) Use of recombinant viral vectors, which when replicated produce sRNAs in plants and these are directed to a fragment of the

ingeniería genética y a través de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, resultando en una planta que es un organismos genéticamente modificado u OGM (Halder *et al.*, 2022; Ghag *et al.*, 2019; Koch y Wassenegeger, 2021). La mayoría de los genes que han sido dianas en los hongos han sido genes estructurales, reguladores del desarrollo



| Naturales             | Sintéticos              |
|-----------------------|-------------------------|
| sRNA fúngicos         | sRNA derivados de dsRNA |
| Hairpin RNA fúngicos  |                         |
| sRNA vegetales        |                         |
| Hairpin RNA vegetales |                         |

**Figure 2.** Global representation of sRNA movement and their functions between the fungus and plant host. The plant sRNA is delivered in extracellular vesicles, targeting the fungal cell to silence fungal genes involved in growth and virulence. The fungal sRNAs promote its virulence and growth, as well as they suppress the plant defense. This process of interchanging sRNA between the pathogen and the host is called “Cross-kingdom iRNA”. When exogenous double strand sRNA, dsRNA, (designed to target important fungal genes involved in growth and virulence) are sprayed directly on the fungus or on the leaf, they are later absorbed by the fungus resulting in siRNA that silence the targeted genes. The figure also shows that artificial silencing (designed with biotechnological purposes), occur in the pathosystem at same time as host genes silencing because natural sRNAs delivered by the fungus, as well as fungal genes silencing because natural sRNAs delivered by the host.

**Figura 2.** Representación global del movimiento de sARNs y sus funciones entre el hongo y el hospedante. Los sRNA vegetales son enviados a través de vesículas extracelulares hacia la célula fúngica para silenciar genes involucrados en su crecimiento o virulencia. Los sRNA fúngicos promueven la virulencia y el crecimiento del hongo, y también bloquean la respuesta vegetal de defensa. Este proceso de intercambio de sRNAs entre patógenos y hospedantes es llamado “Crosskingdom iRNA” (interferencia entre reinos mediado por ARN). Cuando los sRNA de doble cadena (dsRNA) exógenos (diseñados contra dianas importantes, generalmente involucrados en el crecimiento fúngico y/o su virulencia), son asperjados directamente sobre el hongo o sobre la hoja, son absorbidos por el hongo, dando lugar a siRNA que bloquean los genes diana que se seleccionaron. La figura muestra también que el silenciamiento artificial (diseñado con fines biotecnológicos), ocurre en el patosistema al mismo tiempo que el silenciamiento de genes del hospedante por envío de sRNAs naturales por parte del hongo, y también silenciamiento de genes del hongo por envío de sRNAs naturales por parte del hospedante.

transcribed target, thus triggering its silencing. This procedure is known as virus-induced gene silencing (VIGS) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). An example of this is the use of the Barley stripe mosaic virus (BSMV) to silence important genes of the fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* to avoid the infection of wheat (*Triticum aestivum*) (Qi *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 201). 3) The exogenous application of dsRNA, homologous to genes exclusive to the pathogen. This method is known as spray-induced gene silencing (SIGS) (Wang and Jin, 2017). Both HIGS and VIGS imply the use of genetically modified organisms (GMOs); the former, because it requires the genetic transformation of the plants of interest and the latter, because of the genetic modification of the viruses, with the constructs of expression, to replicate in plant cells and transcribe the sRNAs (Figure 3). Table 1 shows a summary of the comparison of the three techniques, as well as the advantages and disadvantages of each one. In several countries, the regulations on the use of

y factores de patogenicidad (Yin y Hulbert, 2015). 2) uso de vectores virales recombinantes, que al replicarse producen los sRNA en las plantas, dirigidos contra un fragmento del transcrito diana y de esta manera desencadena su silenciamiento. Este procedimiento se conoce como VIGS, por “virus-induced gene silencing” (silenciamiento génico por dsRNA producidos con base en un vector viral) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). Un ejemplo es el uso del Virus del mosaico estriado de la cebada (*Barley stripe mosaic virus*-BSMV) para el silenciamiento de genes importantes del hongo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* y evitar la infección del trigo (*Triticum aestivum*) (Qi *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 201). 3) la aplicación exógena de dsRNA, homólogos a genes exclusivos del patógeno. A este método se le conoce como SIGS, por “spray induced gene silencing”, o silenciamiento génico inducido por aspersión de dsRNA (Wang y Jin, 2017). Tanto HIGS como VIGS implican el manejo de organismos genéticamente modificados (OGMs); el

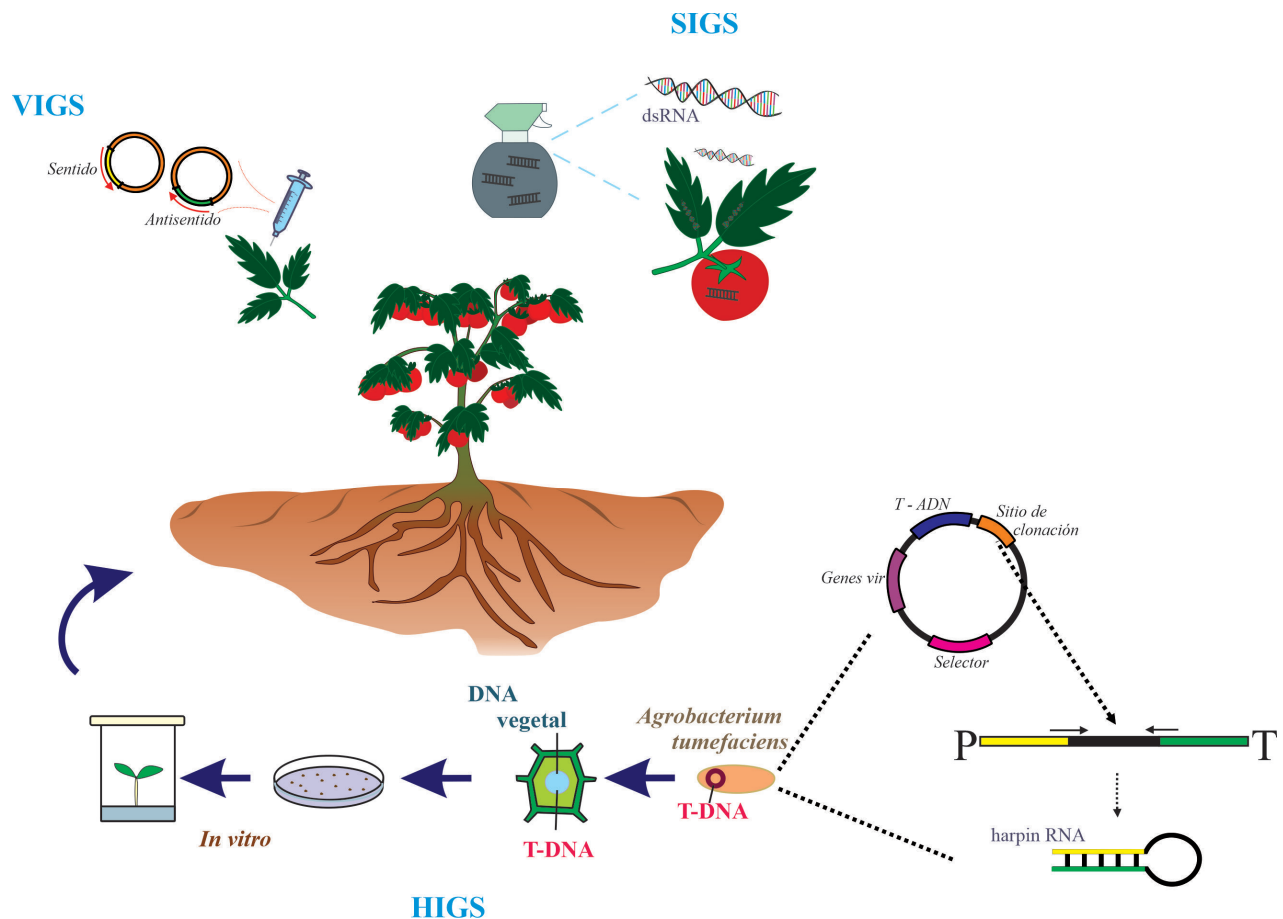


Figure 3. Schematic representation of the different control approaches based on the interfering RNA mechanism. HIGS (host induced gene silencing); in HIGS the host is transformed and genetically modified for endogenous generation of artificial sRNA; silencing cassette is introduced by *Agrobacterium tumefaciens* with a T-DNA cassette in which there are cloning the sense fragment (yellow square, arrow with right end), the antisense fragment (green square, arrow with left end), both flanking an independent sequence (black rectangle). Yellow and green sequences are the same sequences but inverted each other, then, they are complementary. In the expression cassette, P corresponds to the promoter and T to the terminator. When dsRNA is transcribed, it gets a hairpin structure. VIGS (virus induced gene silencing); the virus is genetically modified to produce each strand of sRNA (sense and antisense). SIGS (spray induced gene silencing) by exogenous sprayed dsRNA.

Figura 3. Representación esquemática de los diferentes enfoques de control usando el mecanismo de RNA de interferencia. HIGS (host induced gene silencing; es silenciamiento génico mediado por sRNA producidos en el hospedante); en HIGS el hospedante es transformado y modificado genéticamente para la generación de sRNA artificiales endógenos; el casete de silenciamiento es introducido mediante *Agrobacterium tumefaciens* con un vector de tipo T-DNA en el que se clonan los fragmentos sentido (barra amarilla con flecha a la derecha) y antisentido (barra verde, con flecha a la izquierda) flanqueando una secuencia independiente (representada con un rectángulo negro). Las regiones amarillo y verde son las mismas secuencias, pero invertidas una respecto a la otra, por lo que son complementarias. En el casete de expresión, P corresponde al promotor y T al terminator. Al transcribirse el dsRNA, se forma una estructura tipo harpin. En VIGS (virus induced gene silencing; silenciamiento génico por dsRNA producidos por vectores virales), el virus es genéticamente modificado para la generación de cada una de las hebras del sRNA (sentido y antisentido). SIGS (spray induced gene silencing), es el silenciamiento génico por dsRNA asperjados exógenamente.

**Table 1. Comparison of technologies based on interference RNA for the control of pests and agricultural diseases.****Cuadro 1. Comparación de tecnologías basadas en ARN de interferencia para el control de plagas y enfermedades agrícolas**

| Tecnología | Significado del acrónimo                                                                               | Descripción                                                                                                                                         | Ventajas                                                                                                                                                                                                                         | Desventajas                                                                                                                                                                                                                                                                   | Referencias                                                                                                                                        |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HIGS       | Host Induced Gene Silencing (silenciamiento génico por la producción de dsRNA por el hospedante).      | La planta es transformada con un vector de ADN que integra el constructo de silenciamiento al genoma.                                               | Producción estable y permanente de los dsRNA. Los dsRNA tienen mayor probabilidad de absorción por los patógenos de diferentes reinos.<br>El procesamiento de los dsRNA depende de la maquinaria de silenciamiento de la planta. | Requiere protocolos de transformación y regeneración a planta de la especie que se quiera convertir en HIGS.<br>La planta es OGM. Poca aceptación de consumidores.                                                                                                            | Halder <i>et al.</i> , 2022; Papadopoulou <i>et al.</i> , 2020; Wang <i>et al.</i> , 2016                                                          |
| VIGS       | Virus Induced Gene Silencing (silenciamiento génico por dsRNA producidos con base en un vector viral). | La planta es inoculada con el vector de silenciamiento viral que contiene un fragmento del gen diana. El nuevo ADN no se integra al genoma vegetal. | No requiere de un protocolo de transformación de la planta de interés. El vector VIGS se inocula por bombardeo o agroinfiltración.<br>El procesamiento de los dsRNA depende de la maquinaria de silenciamiento de la planta.     | Requiere que el vector VIGS sea capaz de moverse, replicarse y transcribirse en la planta de interés.<br>La producción de los dsRNA es temporal. No provee de una resistencia permanente hacia los patógenos.<br>El vector viral es un OGM.                                   | Halder <i>et al.</i> , 2022; Villanueva-Alonzo <i>et al.</i> , 2022                                                                                |
| SIGS       | Spray Induced Gene Silencing (silenciamiento génico inducido por dsRNA asperjados).                    | Los dsRNAs son producidos por transcripción <i>in vitro</i> o sintetizados químicamente.                                                            | Para la transcripción <i>in vitro</i> se generan constructos de silenciamiento, pero los OGMs solo se manejan en el laboratorio. Las plantas asperjadas con dsRNA no son OGMs.                                                   | Los dsRNA entran de manera ineficiente a la planta y se degradan fácilmente sobre la superficie vegetal.<br>La producción <i>in vitro</i> actualmente es costosa.<br>El éxito del silenciamiento depende de que el patógeno posea una maquinaria de silenciamiento eficiente. | Gurusamy <i>et al.</i> , 2020a, 2020b; Hoffle <i>et al.</i> , 2020; Koch y Wassenecker, 2021; Qiao <i>et al.</i> , 2021; Sarkar y Roy-Barman, 2021 |

GMOs in the field is still restricted, which means an opportunity for SIGS, since the exogenously applied dsRNA are temporary and does not require the creation or application of GMOs in the field. The aim of this manuscript is to present the potential of SIGS as the option for the use of iRNA in the field for the management of phytopathogenic fungi, particularly in Mexico and Latin America, and the aspects that still need to be overcome for this technology to be successfully used in the field.

In the cases of HIGS and VIGS, for the processing of the dsRNAs (that is, the cutting of the dsRNAs into siRNA by Dicer, the recognition of the siRNAs by Argonaut and the formulation of the RICS complex), depends almost entirely on the mechanism of the plant (Höfle *et al.*, 2020), whereas in SIGS, it depends on the ability of the pathogen to absorb and process the dsRNAs into siRNA (Koch and Wassenegger, 2021; Qiao *et al.*, 2021). Therefore, in order for the SIGS to be successful, a functional silencing machinery is required in the target organism. Consequently, it is important to analyze the components of the fungal silencing machinery.

### Silencing machinery in fungi

As mentioned earlier, the silencing system is conserved in eukaryotes. In the first reports on *Neurospora crassa* and *Schizosaccharomyces pombe*, silencing was given the name of “quelling.” Thus, fungal proteins related to silencing were named QDE, or “quelling defective.” But these names may be confusing because while QDE1 is a DNA- dependent RNA polymerase, QDE2 is an argonaut protein. Similarly, SMS2 (Suppressor of meiotic silencing 2) is a homologous to argonaut protein in *Neurospora crassa* (Gaffar *et al.*, 2019). Although narratives on the first investigations keep mentioning QDE proteins, the tendency is to name

primero porque requiere la transformación genética de las plantas de interés y el segundo por la modificación genética de los virus, con los constructos de expresión, para replicarse en las células vegetales y transcribir los sRNA (Figura 3). El Cuadro 1 muestra un resumen de la comparación de las tres técnicas, así como las ventajas y desventajas de cada una. En varios países las regulaciones del uso de OGMs en el campo aun es restringido, lo que abre una ventana de oportunidad para el SIGS, ya que los dsRNA aplicados exógenamente son transitorios y no requiere crear o aplicar OGMs en el campo. El objetivo de este manuscrito es presentar el potencial del SIGS para convertirse en la vía de uso de los iRNA en el campo para el manejo de hongos fitopatógenos, en particular en México y en Latinoamérica, y los aspectos que faltan superar para que esta tecnología pueda usarse exitosamente en el campo.

En los casos de HIGS y VIGS, para el procesamiento de los dsRNA (es decir, el corte de los dsRNA a siRNA por Dicer, el reconocimiento de los siRNA por Argonauta y la formación del complejo RISC), depende casi totalmente de la maquinaria de la planta (Höfle *et al.*, 2020), mientras que en el SIGS depende de la capacidad del patógeno de absorber y procesar los dsRNA en siRNA (Koch y Wassenegger, 2021; Qiao *et al.*, 2021); por tanto, para el éxito del SIGS se requiere una maquinaria funcional en el microorganismo diana. En consecuencia, es importante analizar los componentes de la maquinaria de silenciamiento de los hongos.

### Maquinaria de silenciamiento en los hongos

Como se ha mencionado previamente, el sistema de silenciamiento es conservado en los eucariotas. En los primeros reportes realizados en *Neurospora crassa* y *Schizosaccharomyces pombe*, el silenciamiento recibió el nombre de “quelling” (sofoco o

proteins of the silencing system like their plant counterparts, that is, dicer (DCL), argonaut (AGO) and RNA-dependent RNA polymerase (RDRP). In fungi, the number of members described in these families are lower than those described in the plants. For example, in the plant kingdom, more than 15 members of the AGO family have been described, along with at least 6 RDRP (García-Ruiz *et al.*, 2016), while in fungi, three AGO members are known, along with two DCLs and five suppressors of ascus, or SAD (Lax *et al.*, 2020).

Gene silencing in fungi, as in other eukaryotes, participates in multiple processes (Figure 1) such as the regulation of genetic expression, the formation of heterochromatin, defense against viruses, the control of transposable elements, adaptation to conditions of stress, cell division and development, as well as in pathogenesis (Lax *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021). Recently, Gaffar and collaborators (2019) studied the conidiation, ascoprogenesis, virulence and production of the metabolite deoxynivalenol in *Fusarium graminearum* and observed different combinations of AGO, DCL and RDRP in the different processes, which shows the complexity of the mechanism for the silencing, despite the fact that only a few members in the main families of the proteins involved are known in fungi.

### The role of interference RNA in fungal virulence

Silencing plays an important role in the virulence of fungi (Gaffar *et al.*, 2019; Weiberg *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021), therefore these proteins have been proposed as targets for the control of plant pathogens (Haile *et al.*, 2021; Werner *et al.*, 2020). For example, *Botrytis cinerea* is able to release sRNAs (Bc-sRNAs) during the infection of its host's cells (Cai *et al.*, 2018). These Bc-sRNAs act by sequestering

apagamiento de la expresión génica). Así, las proteínas fúngicas relacionadas al silenciamiento recibieron los nombres de QDE, por “quelling defective”. Pero estas denominaciones pueden ser confusas porque mientras QDE1 es una ARN polimerasa dependiente de ADN, QDE2 es una proteína tipo argonauta. Similarmente, SMS2 (por “Suppressor of meiotic silencing 2”), es una proteína homóloga a argonauta en *Neurospora crassa* (Gaffar *et al.*, 2019). Aunque en las narrativas sobre las primeras investigaciones se siguen mencionando a las proteínas QDE, la tendencia es nombrar a las proteínas del sistema de silenciamiento como sus homólogas en plantas, es decir como dicer (DCL), argonauta (AGO), y ARN Polimerasas dependientes de ARN (RDRP, por RNA-dependent RNA polymerase). En los hongos el número de miembros descritos en estas familias son menores a las descritas en las plantas. Por ejemplo, en el reino vegetal se han descrito más de 15 miembros en la familia AGO y al menos 6 RDRP (García-Ruiz *et al.*, 2016); mientras que en los hongos se conocen tres miembros de AGO, dos DCL y cinco helicasas tipos SAD (por “suppressor of ascus”; supresor de la formación de las ascas) (Lax *et al.*, 2020).

El silenciamiento génico en los hongos, como en otros eucariontes, participa en múltiples procesos (Figura 1) como son la regulación de la expresión genética, la formación de heterocromatina, la defensa contra virus, el control de elementos transponibles, la adaptación a condiciones de estrés, la división celular y desarrollo, y también en la patogénesis (Lax *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021). Recientemente, Gaffar y colaboradores (2019) al estudiar los procesos de conidiación, ascopogénesis, virulencia y producción del metabolito deoxinivalenol en *Fusarium graminearum* observaron diferentes combinaciones de AGO, DCL y RDRP en los diferentes procesos, lo que evidencia la complejidad del mecanismo de silenciamiento a pesar

the AGO protein of the host, such as *Arabidopsis thaliana* or *Solanum lycopersicum*, which is key in the defense system of both hosts (Weiberg *et al.*, 2013). Interestingly, a single sRNA, named Bc-siR37, suppresses at least eight genes involved in the defense of *A. thaliana*. Among these, WRKY transcription factors, receptor kinases and cell wall modifying enzymes (Wang *et al.*, 2017). *Verticillium dahliae* is another pathogen in which the role of the sRNAs has been studied regarding the invasion of the host, and it was found that it uses mechanisms similar to those described for *B. cinerea* (Wang *et al.*, 2016). In another example, *Fusarium graminearum* also releases Fg-sRNAs, which help silence defense genes in hosts, favoring their colonization (Jian and Liang, 2019; Werner *et al.*, 2021). When *F. graminearum* invades wheat (*T. aestivum*), it secretes the sRNA Fg-sRNA1, which reduces the expression of a chitin elicitor binding protein (TaCEBiP) that has the function of eliciting the defense (Jian and Liang, 2019). In addition, it has been proven that DCL-dependent Fg-sRNAs generally regulate the expression of defense genes in grasses (Werner *et al.*, 2021). The elimination of several components of the siRNA production system, particularly DCL1 and AGO2, results in a reduction of blight in wheat spikes, highlighting the importance of these proteins in the virulence of *F. graminearum* (Gaffar *et al.*, 2019). Due to this, both genes (DCL1 and AGO2) have been proposed for the control of this pathogen in barley leaves (*H. vulgare*) (Werner *et al.*, 2020). On the other hand, in *Penicillium italicum*, protein DCL2 regulates the expression of the microRNAs, and contributes in crucial ways to the pathogenesis (Yin *et al.*, 2020), which shows that the importance of the different DCLs can vary between species. It is worth clarifying that, in the case of fungi, miRNAs are called micro-RNA like (milRNAs). Recently, Haile and collaborators (2021) created a chimera

de que en los hongos se conocen pocos miembros en las principales familias de las proteínas involucradas.

### **Papel del ARN de interferencia en la virulencia fúngica**

El silenciamiento juega un papel importante en la virulencia de los hongos (Gaffar *et al.*, 2019; Weiberg *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021), por lo que estas proteínas se han propuesto como dianas para el control de patógenos vegetales (Haile *et al.*, 2021; Werner *et al.*, 2020). Por ejemplo, *Botrytis cinerea* es capaz de liberar sRNAs (Bc-sRNAs) durante la infección de las células de sus hospedantes (Cai *et al.*, 2018). Estos Bc-sRNAs actúan secuestrando a la proteína AGO del hospedante, por ejemplo de *Arabidopsis thaliana* o *Solanum lycopersicum*, la cual es pieza clave en el sistema de defensa en ambos hospedantes (Weiberg *et al.*, 2013). Interesantemente, un solo sRNA, nombrado Bc-siR37, suprime al menos ocho genes involucrados en la defensa de *A. thaliana*. Entre ellos, factores de transcripción tipo WRKY, cinasas tipo receptores y enzimas modificadoras de la pared celular (Wang *et al.*, 2017). *Verticillium dahliae* es otro patógeno en el que se ha estudiado el papel de los sRNA en la invasión del hospedante, y se encontró que usa mecanismos parecidos al descrito en *B. cinerea* (Wang *et al.*, 2016). En otro ejemplo, *Fusarium graminearum* también libera Fg-sRNAs, los cuales le permiten silenciar genes de defensa en los hospedantes, favoreciendo la colonización (Jian y Liang, 2019; Werner *et al.*, 2021). Cuando *F. graminearum* invade trigo (*T. aestivum*), secreta el sRNA Fg-sRNA1, el cual reduce la expresión de una proteína que posee dominio de unión a quitina (“chitin elicitor binding protein”, TaCEBiP) que posee función elicitora de la defensa (Jian y Liang, 2019). Adicionalmente, se ha comprobado



to silence the expression of both DCL genes in *Plasmopara viticola*, a strategy which suppressed the ability of this pathogen to colonize grapevines (*Vitis vinifera*).

In the fungus *Valsa mali*, virulence is regulated with a miRNA called VdmilR1, which operates at a transcriptional level on the extreme 3' UTR of VdHy1 through the K9 methylation of histone H3; VdHy1 is necessary for the virulence of *V. mali* on *Gossypium herbaceum* (cotton) plants (Jin *et al.*, 2019). Interestingly, unlike other canonical pathways for the biogenesis of miRNAs, the biogenesis of VdmilR1 does not depend on DCL or AGO, but on a protein called VdR3, which contains a domain of RNase III (Jin *et al.*, 2019), which highlights the importance of particularly characterizing the pathosystem to be controlled. Likewise, miRNAs play a crucial role in the posttranscriptional regulation of *V. mali* virulence genes during the infection in *Malus domestica* (apple) (Xu *et al.*, 2020), as well as in the destabilization of the defense system of the host (Xu *et al.*, 2022). These data suggest that the silencing machinery as a whole provides a mechanism maintained in fungi for the invasion of their hosts (Figure 2). Most sRNAs have the goal of inhibiting genes related to the plant defense system, and function in similar ways to the effector proteins of the pathogens (Todd *et al.*, 2023).

## POSSIBILITIES OF INTERFERENCE RNA IN AGRICULTURE

It has been suggested that the use of iRNA can represent a powerful technological tool for the control of fungal diseases in plants (Wang and Jin, 2017; Zotti *et al.*, 2018), and other pathogens such as viruses, insects and nematodes (Koch and Wassenecker, 2021). In the case of HIGS, most

que los Fg-sRNAs dependientes de DCL, regulan en general la expresión de los genes de defensa en las gramíneas (Werner *et al.*, 2021). La eliminación de varios componentes del sistema de producción de iRNA, en particular DCL1 y AGO2, tiene como resultado una disminución del tizón en espigas de trigo, resaltando la importancia de estas proteínas en la virulencia de *F. graminearum* (Gaffar *et al.*, 2019). Por esa razón, ambos genes (DCL1 y AGO2) han sido propuestos para el control de este patógeno en hojas de cebada (*H. vulgare*) (Werner *et al.*, 2020). En *Penicillium italicum* en cambio, la proteína DCL2 es la que regula la expresión de los microRNAs, y contribuye de manera crucial en la patogénesis (Yin *et al.*, 2020), lo que evidencia que la importancia de las diferentes DCL puede variar entre especies; cabe aclarar que en el caso de los hongos los miRNAs reciben el nombre de milRNAs (por micro-RNA like o *parecidos* a los micro-ARNs). Recientemente, Haile y colaboradores (2021) construyeron una quimera para silenciar la expresión de ambos genes DCL en *Plasmopara viticola*, estrategia que logró suprimir la capacidad de este patógeno para colonizar la vid (*Vitis vinifera*).

En el hongo *Valsa mali* la virulencia se regula con un miRNA nombrado VdmilR1, que opera a nivel transcripcional sobre el extremo 3' UTR de VdHy1 a través de la metilación K9 de la histona H3; VdHy1 es necesaria para la virulencia de *V. mali* sobre plantas de *Gossypium herbaceum* (algodón) (Jin *et al.*, 2019). Interesantemente, a diferencia de otras rutas canónicas de biogénesis de miRNAs, la biogénesis de VdmilR1 no depende de DCL ni de AGO, pero si de una proteína llamada VdR3 que contiene un dominio de RNasa III (Jin *et al.*, 2019), lo que pone en relieve la importancia de caracterizar en particular el patosistema que se quiere controlar. Igualmente, los miRNAs juegan un papel fundamental en la regulación post-trans-

papers are based on the use of binary vectors that overexpress inverted sequences, separated by an intron, which help to form the hairpin (Figure 3). However, this approach is restricted to plants with established transformation methods, while most plants of agronomic interest do not have these protocols (Halder *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2016). The greatest limitation in many countries is the inherent use of GMOs, due to the limited acceptance and lack of regulations for their use (Papadopoulou *et al.*, 2020). In the case of VIGS, it uses RNA or DNA viral vectors with the ability to transcribe foreign genes, without having to transform the entire plant (Halder *et al.*, 2022; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). This approach is limited to the availability and efficiency of viral vectors for the plant of interest, but it also implies the management of genetically manipulated viral genomes (Figure 3). On the other hand, in the SIGS technology, dsRNAs are applied exogenously on the surface of the plant tissue, without the need for transformation (Koch *et al.*, 2016; Sarkar and Roy-Barman, 2021). For the use of SIGS, the dsRNAs are produced by the chemical synthesis of each independent strand (sense and antisense), which are then mixed equimolarly, that is, in equal amounts, to generate the double strand. The chemical synthesis of each strand is analogous to the commercial synthesis of oligonucleotides, but using ribonucleotides as building blocks for the synthesis of the RNA strands. The dsRNAs can also be produced by *in vitro* transcription. In this case, the sequence chosen to silence in the target transcript is cloned in a circular DNA vector under the regulation of a promoter of bacteriophage origin such as T3, T7 or SP6. Two clones are generated, one of which has a sequence in a sense direction (5'-3'), and the other, in an antisense direction (3'-5'). For the transcription, both vectors are linearized with a restriction enzyme that has

cripcional de genes de virulencia en *V. mali* durante la infección en *Malus domestica* (manzana) (Xu *et al.*, 2020), así como en la desestabilización del sistema de defensa del hospedante (Xu *et al.*, 2022). Estos datos sugieren que la maquinaria de silenciamiento en su conjunto provee un mecanismo conservado en los hongos, para la invasión de sus hospedantes (Figura 2). Los sRNA en su mayoría tienen como objetivo inhibir genes relacionados al sistema de defensa vegetal, y funcionan parecido a las proteínas efectoras de los patógenos (Todd *et al.*, 2023).

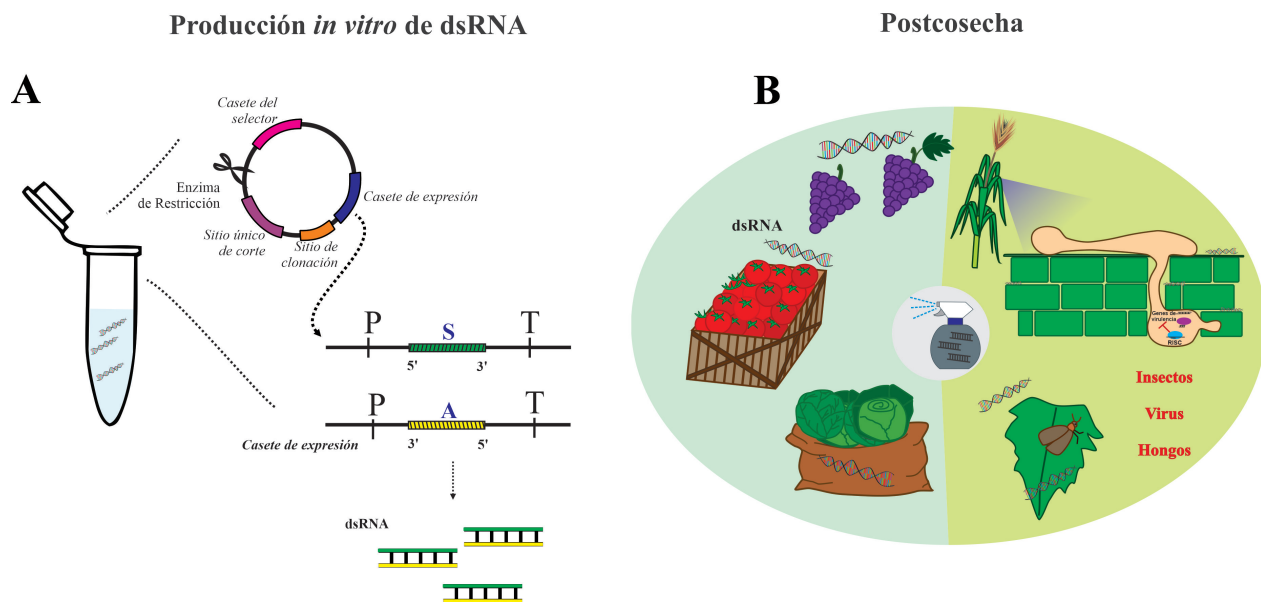
## POSIBILIDADES DEL ARN DE INTERFERENCIA EN LA AGRICULTURA

Se ha propuesto que el uso del iRNA puede representar una poderosa herramienta tecnológica para el control de enfermedades fúngicas de plantas (Wang y Jin, 2017; Zotti *et al.*, 2018), y otros patógenos como virus, insectos y nematodos (Koch y Wassenegger, 2021). En el caso de HIGS, la mayoría de los trabajos se basan en el uso de vectores binarios que sobreexpresan secuencias invertidas, separados por un intrón, que permite la formación de la horquilla o “hairpin” (Figura 3). Sin embargo, este tipo de enfoques está restringido a plantas en las que existen métodos de transformación establecidos, y para la mayoría de las plantas de interés agronómico no se cuenta con estos protocolos (Halder *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2016). La mayor limitante en muchos países es el uso inherente de OGMs, debido la limitada aceptación y falta de regulaciones para su uso (Papadopoulou *et al.*, 2020). En el caso de VIGS, usa vectores virales de ARN o ADN que tienen la capacidad de transcribir genes foráneos, sin tener que transformar a la planta completa (Halder *et al.*, 2022; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). Este enfoque está limitado a la disponibilidad

only one restriction site in these vectors. The *in vitro* transcription is carried out in a tube with a reaction mixture containing the linearized vectors, an RNA polymerase that recognizes the promoter being used (whether T3, T7 or SP6), and the ribonucleotides (Li and Zamore, 2019; Sun and Riggs, 2017). Figure 4A shows how the dsRNAs are synthesized *in vitro*.

SIGS has a regulatory advantage, since the crops sprayed with the dsRNAs are not considered

y eficiencia de vectores virales para la planta de interés, pero también implica el manejo de genomas virales manipulados genéticamente (Figura 3). Por su parte, en la tecnología de SIGS los dsRNA se aplican de forma exógena sobre la superficie del tejido vegetal, sin necesidad de transformación (Koch *et al.*, 2016; Sarkar y Roy-Barman, 2021). Para el uso de SIGS, los dsRNA se producen mediante la síntesis química, de cada cadena independiente (sentido y antisentido), las cuales luego se



**Figure 4.** SIGS for controlling fungi, viruses and insects. A) *in vitro* production of dsRNA for exogenous spray. The target fragment is cloning in a circular vector under control of a bacteriophage promoter (T3, T7 o SP6); one vector is created for sense strand and another vector for antisense strand. For *in vitro* transcription, the vector is linearized with a restriction enzyme that cut one time on the vector (unique site), and that template is mixed with the ribonucleotides and the RNA polymerase (T3, T7 o SP6 RNA polymerase, according the promoter in use), that carried out the *in vitro* synthesis of dsRNA. In the expression cassette, P corresponds to the promoter and T to the terminator. Both strands (sense and antisense) are synthesized and form the dsRNA B) The use of SIGS for controlling pathogens and pests on post-harvest fruit and vegetables is one of the applications that can be achieved soon.

**Figura 4.** SIGS para el control de hongos, virus e insectos. A) Producción *in vitro* de los dsRNA para la aspersión exógena. El fragmento diana es clonado en un vector circular bajo la regulación del promotor de un bacteriófago (T3, T7 o SP6); se genera un vector para la cadena sentido y otro para la cadena antisentido. Para la transcripción *in vitro*, el vector es linealizado con una enzima de restricción que corta una sola vez el vector (sitio único), y ese templado se mezcla con los ribonucleótidos y la ARN polimerasa (T3, T7 o SP6 ARN polimerasa, según sea el promotor usado), que lleva a cabo la síntesis *in vitro* del dsRNA. En el casete de expresión, P corresponde al promotor y T al terminador. Se sintetizan las dos hebras (sentido y antisentido) que forman el dsRNA. B) El uso de SIGS para el control de patógenos y plagas en frutas y verduras en condiciones de post cosecha es una de las aplicaciones que se puede lograr más pronto.

as GMOs (Dalakouras *et al.*, 2020; Taning *et al.*, 2020). However, there are also limitations that must be overcome in order to apply SIGS in the field.

## EXTERNAL APPLICATIONS ON NON-MODEL PLANTS AND POST-HARVEST PRODUCTS

The use of SIGS is an alternative to the classic plant genetic transformation. This approach has been described as eco-friendly, highly specific and with a wide range of crops it can be used on. It is worth mentioning that it can be applied on crops in the field, as well as on harvested agricultural products (Figure 4B).

The first analyses regarding its feasibility were performed on plants such as *Nicotiana benthamiana* and *A. thaliana* (Dalakouras *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016), but it has also been evaluated on barley (*H. vulgare*), rice (*Oryza sativa*), canola (*Brassica napus*), and cucurbits (Haile *et al.*, 2021; Kaldis *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Sarkar and Roy-Barman, 2021); in harvested strawberry (*Fragaria vesca*), grapevine (*Vitis vinifera*), tomato (*S. lycopersicum*) and apple (*M. domestica*) fruits (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016); as well as vegetables such as lettuce (*Lactuca sativa*) and onion (*Allium cepa*) (Qiao *et al.*, 2021) and flowers (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016). The topical application of the dsRNAs has been observed to provide protection, not only in the area on which it is applied, but also in other parts of the plant. The ability of plants to absorb dsRNA through their leaves varies, although there are alternatives such as applying on the petioles (Dalakouras *et al.*, 2018). Studies with *Sclerotinia sclerotiorum* suggest that the absorption of the dsRNAs in fungi takes place predominantly on the tip of the hypha, through endocytosis mediated by the protein

mezclan de manera equimolar, es decir en las mismas cantidades, para dar lugar a la doble cadena. La síntesis química de cada cadena es análoga a la síntesis comercial de oligonucleótidos, pero empleando ribonucleótidos como bloques de construcción para la síntesis de las cadenas de ARN. Los dsRNA también pueden producirse mediante transcripción *in vitro*. En este caso la secuencia que se seleccionó para silenciar en el transcrito diana, se clona en un vector de ADN circular, bajo la regulación de un promotor de origen bacteriófago, como T3, T7 o SP6. Se generan dos clonas, una con la secuencia en sentido (dirección 5'-3'), y la otra con la secuencia en antisentido (dirección 3'-5'). Para la transcripción, ambos vectores son digeridos con una enzima de restricción que tiene un solo sitio de corte en estos vectores y éstos se abren y quedan linealizados. La transcripción *in vitro* se realiza en un tubo, con una mezcla de reacción que contiene los vectores linealizados, una ARN polimerasa que reconozca al promotor que se esté usando (ya sea T3, T7 o SP6), y los ribonucleótidos (Li y Zamore, 2019; Sun y Riggs, 2017). La Figura 4A muestra cómo se sintetizan *in vitro* los dsRNA.

SIGS tiene ventaja regulatoria, ya que los cultivos asperjados con los dsRNA no están considerados como OGMs (Dalakouras *et al.*, 2020; Taning *et al.*, 2020). Sin embargo, también existen limitantes que tendrán que superarse para la aplicación de SIGS en el campo.

## APLICACIONES TÓPICAS EN PLANTAS NO MODELO Y PRODUCTOS COSECHADOS

El uso de SIGS es una alternativa a los trabajos clásicos de transformación genética. Este enfoque se ha descrito como amigable con el medio ambiente, altamente específico y con un amplio espectro de cultivos en los que se pudiera aplicar. Es

clathrin (Wytinck *et al.*, 2020). The results of all these recent investigations show the potential of the dsRNAs to control fungal diseases in agricultural crops.

## ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF dsRNAs IN PLANT PROTECTION

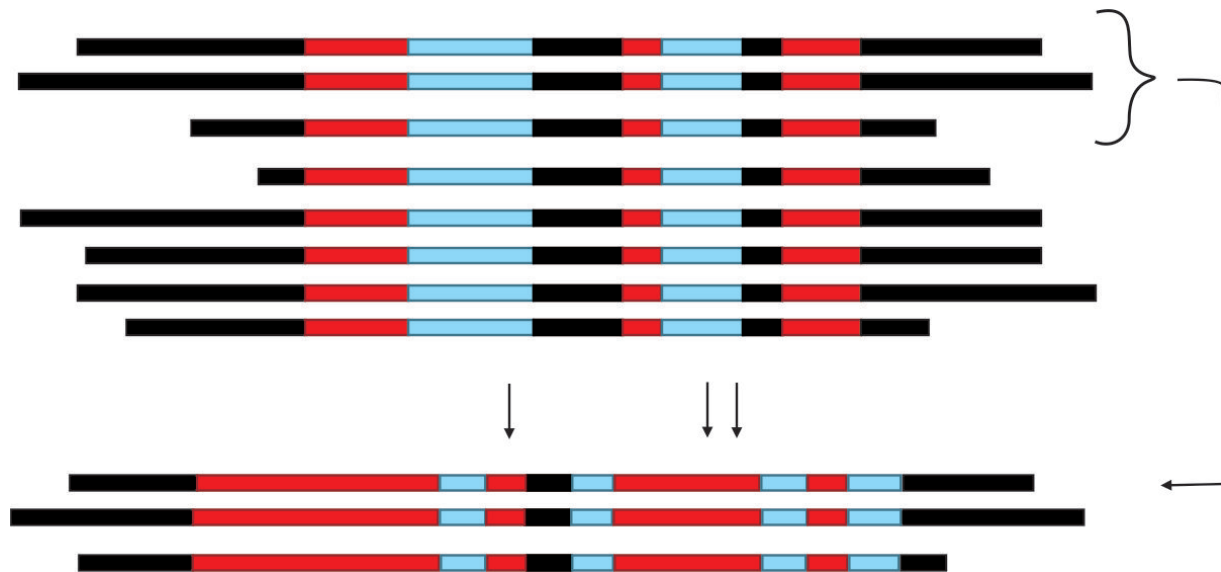
**Specificity of the dsRNAs.** The greatest advantage of using dsRNA is that user can decide to silence a gene or a gene family, or several different genes in an organism, where virulence can be drastically reduced, or the fungal growth can even be drastically reduced. The user can also opt for the silencing the target in one single organism or many organisms simultaneously (Haile *et al.*, 2021; Koch *et al.*, 2019; Nerva *et al.*, 2020; Werner *et al.*, 2020). The specificity of the dsRNAs depends on the sequence used *per se* (Wang *et al.*, 2016). Some fungal genes are monogenic, that is, they appear only once in the genome, for example, the LYS2 gene that encodes the enzyme  $\alpha$ -aminoacidipate reductase, or the HGMR gene, which encodes the enzyme hidroxymethylglutaryl CoA reductase. In these cases, silencing is only on one gene. Other genes have multiple members in the genome and they are said to form a gene family, such as the genes in catalases, chitinases, kinases, etc. For the design of silencing, the sequences of the messenger RNAs are compared and the user can choose a region that is identical for all the family members and silence them all, or silence them by groups, or choose regions that are different in each one and silence a specific member (Figure 5), whether to prove its relevance in the gene family, or because it contributes to the pathogenicity of the fungus. In order to achieve specificity and avoid unwanted targets, it is recommended to direct the design of the silencing towards divergent regions, whether in

importante mencionar que puede ser aplicado tanto a los cultivos en el campo, como en los productos agrícolas ya cosechados (Figura 4B).

Los primeros análisis en cuanto a su factibilidad se realizaron en plantas modelo como *Nicotiana benthamiana* y *A. thaliana* (Dalakouras *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016), pero también se han evaluado en cebada (*H. vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), canola (*Brassica napus*), y cucurbitáceas (Haile *et al.*, 2021; Kaldis *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Sarkar y Roy-Barman, 2021); en frutos cosechados de fresa (*Fragaria vesca*), vid (*Vitis vinifera*), jitomate (*S. lycopersicum*) y manzana (*M. domestica*) (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016); y vegetales como lechuga (*Lactuca sativa*) y cebolla (*Allium cepa*) (Qiao *et al.*, 2021) y flores (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016). Se ha observado que la aplicación tópica de los dsRNA otorga protección no solo en el sitio de aplicación, sino en otras partes de la planta. La capacidad de las plantas para absorber dsRNA a través de las hojas varía, pero existen alternativas como la aplicación en los peciolo (Dalakouras *et al.*, 2018). Estudios con *Sclerotinia sclerotiorum* sugieren que la absorción de las dsRNA en los hongos ocurre predominantemente en la punta de la hifa, a través de endocitosis mediado por la proteína clatrina (Wytinck *et al.*, 2020). Los resultados de todas estas recientes investigaciones muestran el potencial de los dsRNA para el control de enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas.

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS dsRNA EN LA PROTECCIÓN VEGETAL

**Especificidad de los dsRNA.** La gran ventaja de emplear dsRNA es que se puede decidir silenciar un gen o una familia génica, o varios genes diferentes de un organismo, donde se puede disminuir dramáticamente la virulencia o incluso evitar el



**Figure 5.** Strategies for designing dsRNA for either specific or multiple gene silencing. To achieve this, the nucleotide sequences are compared by using any bioinformatic tool for multialignment. The scheme may represent different situations: A) the same gene from different organisms. B) different genes belonging to the same gene family from the same organisms (for example, catalases family because there are multiple genes in the genome of a single organism). The red lines correspond to highly conserved regions, even 100%; the blue lines correspond to moderated conserved regions, and black lines to highly divergent regions. The dsRNA designed on the red regions in the alignment are able to silence the gen in different organisms (situation A), or all gene members in the gene family (situation B) in one organism (non-specific dsRNA). The dsRNA designed on the black regions will silence specifically the gene in a single organism with no silencing on others (situation A), or a single gene in a gene family (situation B) (specific dsRNA). The alignment below corresponds to: C) the same gene from close relative organisms, or D) members belonging to a gene subfamily; it is observed that some regions which were blue in the global alignment (above), in the close relatives (situation C) or the gene subfamily (situation D) become highly conserved (in red), and allow to design dsRNA able to silence that group of close relative organisms, but not others (situation C), or all members belonging to this subfamily, but with no interference on other members in this gene family (situation D).

**Figura 5.** Estrategias para diseñar dsRNA para el silenciamiento específico o múltiple de genes. Para ello, se comparan las secuencias de nucleótidos mediante alguna herramienta bioinformática para alineamientos múltiples. El esquema puede representar diferentes situaciones: A) el mismo gen, pero las secuencias son de diferentes organismos. B) los diferentes genes de una familia génica de un mismo organismo (por ejemplo, la familia de las catalasas, porque hay múltiples genes en el genoma de un organismo). Las barras rojas representan las regiones altamente conservadas, incluso al 100%; las barras azules corresponden a regiones moderadamente conservadas, y las negras a las regiones más divergentes. Los dsRNA diseñados sobre las regiones rojas serían capaces de silenciar el gen en diferentes organismos (situación A) o a todos los miembros de la familia génica (situación B) en un organismo (dsRNA no específicos). Los dsRNA diseñados sobre alguna de las secuencias en negro producirán silenciamiento específico, ya sea del gen de un organismo sin afectar a otros (situación A), o de un solo gen en una familia génica en un organismo (situación B) (dsRNA específico). El alineamiento de abajo puede representar: C) un gen en un grupo de organismos filogenéticamente muy cercanos, o D) los miembros de una subfamilia génica; se observa que algunas regiones que eran azules en el alineamiento global (de arriba), en los organismos más cercanos (situación C) o la subfamilia génica (situación D) son altamente conservadas (en rojo), y permiten diseñar dsRNA que silencian a ese grupo de organismos, sin afectar a otros organismos (situación C), o todos los miembros de la subfamilia, pero sin silenciar otros miembros de esta familia génica (situación D).

the encoding region or in the 5' and 3' UTR ends (Untranslated Regions) of the mRNA, particularly in the case of genes that encode highly conserved proteins. The UTRs are parts of the messenger RNA and they are found on its ends, respectively. They are important for its structure, although they are not translated into amino acids. The UTR sequences vary, even in the genes for highly conserved proteins.

The strategy is similar to apply silencing on a single organism or several species of organisms, a particular genus, etc. That is, it depends on whether regions are chosen that are highly conserved among all of them, or sequences that are exclusive to a particular organism. For example, Gutiérrez-Domínguez *et al.* (2022) recently reported a type of lipase that is only found in some genera of the Hypocreales and Glomerellales orders of filamentous fungi, including the genera *Trichoderma*, *Fusarium*, *Nectria* and *Colletotrichum*. If highly conserved regions are chosen in the gene of this lipase, silencing will occur in all these fungi, but if divergent sequences are chosen between them, silencing can be directed only at those we want to control, preventing them from affecting, for example, the species of the *Trichoderma* genus, which are beneficial fungi for agriculture, whereas the others are phytopathogenic.

The availability of constantly growing public databases of genomes and transcriptomes help to adequately design silencing strategies and prevent it from occurring with non-target organisms, that is, those that do not want to be affected.

**dsRNA, low risk for humans.** According to Fletcher *et al.* (2020), Jensen *et al.* (2013), and Rodrigues and Petrick (2020), the risk of consuming dsRNA in humans is low or none. For the dsRNAs applied on fruits or plants have a possible impact

crecimiento del hongo. También, puede optarse por silenciar el gen de un solo organismo, o de múltiples organismos a la vez (Haile *et al.*, 2021; Koch *et al.*, 2019; Nerva *et al.*, 2020; Werner *et al.*, 2020). La especificidad de los dsRNA depende de la secuencia *per se* empleada (Wang *et al.*, 2016). Algunos genes fúngicos son monogénicos, es decir, están solo una vez en el genoma, por ejemplo, el gen LYS2 que codifica a la enzima  $\alpha$ -aminoadipato reductasa, o el gen HGMR, que codifica a la enzima hidroximetil-glutaril CoA reductasa. En estos casos el silenciamiento es sobre un solo gen. Otros genes tienen múltiples miembros en el genoma y se dice que forman una familia génica; por ejemplo, los genes de catalasas, de quitinasas, de cinasas, etc. Para el diseño del silenciamiento se comparan las secuencias de los ARN mensajeros y se puede elegir alguna región que es idéntica entre todos los miembros de la familia y silenciarlos todos, o silenciarlos por grupos, o seleccionar regiones que son diferentes en cada uno y se silencia un miembro específico (Figura 5), ya sea para probar su relevancia dentro de la familia génica, o porque es el que contribuye a la patogenicidad del hongo. Para lograr la especificidad y evitar dianas no deseadas, se aconseja dirigir el diseño de silenciamiento hacia regiones no conservadas, ya sea dentro de la región codificante o en los extremos 5' y 3' UTR del mRNA (Untranslated Region; región no traducible), sobre todo en el caso de genes que codifican proteínas altamente conservadas. Los UTRs forman parte del ARN mensajero y se localizan respectivamente en los extremos de éste; son importantes para su estructura, pero no son traducidos a aminoácidos. Aun en genes de proteínas altamente conservadas, las secuencias de los UTR varían.

La estrategia que se sigue es similar para aplicar el silenciamiento sobre un solo organismo, o múltiples especies de organismos, un género particular, etc.; es decir, depende si se escogen regiones

in human health, the dsRNAs must have to enter the cells and match with some of the human genes (Fletcher *et al.*, 2020). However, in humans and mammals in general, there are many biological barriers in the gastrointestinal tract, blood flow and at a cellular level in which they are degraded due to the large amount of existing nucleases (Fletcher *et al.*, 2020; Rodrigues and Petrick, 2020). In addition, man has consumed plant dsRNAs naturally by way of their conventional diet in maize (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), rice (*O. sativa*), lettuce and tomato (Jensen *et al.*, 2013). For the suppression of the human gene, the sRNAs would need to be complementary and accumulated in biologically important concentrations in the target site, which does not occur (Jensen *et al.*, 2013).

**No persistence of dsRNAs in the plant.** In a pioneering investigation by Koch and collaborators (2016), they applied in *H. vulgare* (barley) dsRNA designed against transcripts of the green fluorescent protein (GFP) and 48 h later, they infected the leaves with a transformed strain of *F. graminearum*, which produces the GFP. Interestingly, the silencing of GFP remained for 6 days post infection (dpi) in distal regions from where the dsRNA-GFP was applied, indicating its stability in the tissue and that the dsRNA moves inside the plant. In a similar fashion, the application on roses (*Rosa chinensis*) and tomato fruits of dsRNA that silence DCL1/2 of *B. cinerea* protected them against the pathogen for 8 -10 days. Reports on other plants with other fungal pathogens coincide with these times of stability of the dsRNAs (Nerva *et al.*, 2020; Sarkar and Roy Barman, 2021).

Several papers report the application of the dsRNAs first and then they inoculate with the pathogen (Höfle *et al.*, 2020; Koch *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2019; Werner *et al.*, 2020; Sarkar and Roy-Barman, 2021), that is, a preventive effect of the

que están altamente conservadas entre todos ellos, o secuencias que son exclusivas de un organismo particular. Por ejemplo, Gutiérrez-Domínguez *et al.* (2022) reportaron recientemente un tipo de lipasa que en hongos filamentosos sólo está presente en algunos géneros de los órdenes Hypocreales y Glomerellales; estos incluyen los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Nectria*, y *Colletotrichum*. Si se eligen regiones altamente conservadas en el gen de esta lipasa, el silenciamiento ocurriría en todos estos hongos, pero si se eligen secuencias que divergen entre ellas, el silenciamiento puede dirigirse únicamente a las que se quiere controlar, para no afectar por ejemplo a las especies del género *Trichoderma*, que son hongos benéficos para la agricultura, mientras los otros son fitopatógenos.

La disponibilidad de bases de datos públicas de genomas y transcriptomas, las cuales están en constante crecimiento, permiten diseñar correctamente las estrategias de silenciamiento y evitar que éste ocurra en organismos que no son diana, es decir, que no se quieren afectar.

**dsRNA, de bajo riesgo para humanos.** De acuerdo a Fletcher *et al.* (2020), Jensen *et al.* (2013), y Rodrigues y Petrick (2020), el riesgo por consumir dsRNA en humanos es bajo o nulo. Para que los dsRNA aplicados en frutos o plantas tengan un posible impacto sobre la salud humana, los dsRNA tienen que internarse dentro de las células y coincidir con la secuencia de alguno(s) de los genes humanos (Fletcher *et al.*, 2020). Sin embargo, en el humano y mamíferos en general, hay una multitud de barreras biológicas en el tracto gastrointestinal, torrente sanguíneo y a nivel celular, en los que se degradan por la gran cantidad de nucleasas existentes (Fletcher *et al.*, 2020; Rodrigues y Petrick, 2020). Adicionalmente, el hombre ha consumido de manera natural dsRNA de origen vegetal, a través de la dieta convencional en el maíz (*Zea mays*),



infection. Recently, Haile and collaborators (2021) infected de *Vitis vinifera* leaves with *Plasmopara viticola*, they let the disease progress for 7 days, and later applied the dsRNA. This helped reduce the disease progress rate, implying that the control with dsRNAs could also be a curative treatment. However, the dsRNAs applied exogenously are extremely susceptible to degradation and have very low persistence in the environment (Bachman *et al.*, 2020), therefore one of the main challenges for its success in agriculture is extending its stability in the environment.

**Factors that affect the design of dsRNAs for SIGS.** One of the main factors to be taken in consideration when designing the dsRNAs are the molecular targets themselves. Some of the targets that have been considered have included the most conventional ones, such as genes that encode enzymes that synthesize intermediaries in the synthesis of lanosterol (Cytochrome P450 lanosterol C-14 $\alpha$ -demethylase, CYP51) (Koch *et al.*, 2016), the silencing of effectors (Sarkar and Roy-Barman, 2021) and even the silencing components themselves (Wang *et al.*, 2016) (Table 2). Both in experiments performed *in vitro* and in the applications on the surface of leaves, the effect of silencing has been observed to increase as the dose of the dsRNAs increases (Haile *et al.*, 2021, McLoughlin *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2016). However, if the concentration is too high, better results are not obtained; this suggests that the iRNA machinery becomes saturated and it ceases to process the dsRNAs (McLoughlin *et al.*, 2018). Consequently, to achieve the best results with the SIGS, characterizing every pathosystem and determining the most adequate length and concentration of dsRNA is crucial to control the disease.

soya (*Glycine max*), arroz (*O. sativa*), lechuga y jitomate (Jensen *et al.*, 2013). Para la supresión del gen humano se requeriría que los sRNA fueran complementarios y estuvieran acumulados en concentraciones biológicamente importantes en el sitio blanco, lo cual no ocurre (Jensen *et al.*, 2013).

**No persistencia de los dsRNA en la planta.** En un trabajo pionero de Koch y colaboradores (2016), aplicaron en hojas de *H. vulgare* (cebada) dsRNA diseñados contra transcritos de la proteína GFP (green fluorescent protein; proteína verde fluorescente) y 48 h después infectaron las hojas con una cepa de *F. graminearum* transformada, que produce la proteína GFP. Interesantemente, el silenciamiento de GFP se mantuvo durante 6 días post infección (dpi) en regiones distales de donde se aplicó el dsRNA-GFP, lo que muestra su estabilidad en el tejido y que el dsRNA se mueve dentro de la planta; similarmente, la aplicación en rosas (*Rosa chinensis*) y frutos de jitomate (*S. lycopersicum*) de dsRNA que silencian la DCL1/2 de *B. cinerea* los protegió contra este patógeno por 8 -10 días. Reportes en otras plantas, con otros patógenos fúngicos, coinciden con estos tiempos de estabilidad de los dsRNA (Nerva *et al.*, 2020; Sarkar y Roy Barman, 2021).

En varios trabajos reportan la aplicación primero de los dsRNA y luego inoculan con el patógeno (Höfle *et al.*, 2020; Koch *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2019; Werner *et al.*, 2020; Sarkar y Roy-Barman, 2021); es decir, un efecto preventivo de la infección. Recientemente, Haile y colaboradores (2021) infectaron hojas de *Vitis vinifera* con *Plasmopara viticola*, dejaron progresar la enfermedad por 7 días, y posteriormente aplicaron los dsRNA. Estos lograron reducir la tasa de progreso de la enfermedad, implicando que el control con dsRNA pudiese ser también de tipo curativo. Sin embargo, los dsRNA aplicados de manera exógena son extremadamente

**Table 2. Successful examples of SIGS<sup>y</sup> in the inhibition of phytopathogenic fungi.  
Cuadro 2. Ejemplos exitosos del SIGS<sup>y</sup> en la inhibición de hongos fitopatógenos.**

| Hospedante                                                             | Patógeno                       | Gen diana                          | Función                                                                             | Longitud dsRNA (nt)                                                                                                       | Máxima persistencia en la planta o <i>in vitro</i> | Referencias                 |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|
| Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> )                                      | <i>Fusarium graminearum</i>    | FgCYP51A, FgCYP51B, FgCYP51C       | Enzima clave en la biosíntesis de Ergosterol                                        | 791 (20 ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) (CYP51A/CYP51B/CYP51C)                                                                    | 8 días (6 dpi) <sup>z</sup>                        | Koch <i>et al.</i> , 2016   |
| Cebada ( <i>H. vulgare</i> )                                           | <i>F. graminearum</i>          | FgCYP51A, FgCYP51B, FgCYP51C       | Enzima clave en la biosíntesis de Ergosterol                                        | 294 (CYP1A), 220 (CYP1B), 238 (CYP1C), 514 (CYP1A/CYP1B), 532 (CYP1A/CYP51C), 458 (CYP1B/CYP51C)                          | 7 días (5 dpi) <sup>z</sup>                        | Koch <i>et al.</i> , 2019   |
| Cebada ( <i>H. vulgare</i> )                                           | <i>F. graminearum</i>          | DCL, AGO                           | Maquinaria de silenciamiento                                                        | 372 (AGO2/DCL1), 1782 (DCL1/DCL2), 1529 (AGO1/AGO2), 1741 (AGO2/DCL2)                                                     | 7 días <sup>z</sup>                                | Werner <i>et al.</i> , 2020 |
| Cebada ( <i>H. vulgare</i> )                                           | <i>F. graminearum</i>          | FgCYP51A, FgCYP51B, FgCYP51C       | Enzima clave en la biosíntesis de Ergosterol                                        | 500 (CYP51A), 400 (CYP51B), 400 (CYP51C), 800 (CYP51A), 800 (CYP51B), 800 (CYP51C), secuencia completa para CYP51A, B y C | 7 días <sup>z</sup>                                | Höfle <i>et al.</i> , 2020  |
| Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )                               | <i>Botrytis cinerea</i>        | DCL1, DCL2                         | Maquinaria de silenciamiento                                                        |                                                                                                                           | 7 días                                             | Qiao <i>et al.</i> , 2021   |
| Vid ( <i>Vitis vinifera</i> )                                          | <i>B. cinerea</i>              | BcCYP51, BcChs1, BcEF2             | Biosíntesis de ergosterol, quitina y factor de elongación                           | 732 (CYP51/Chs1/EF2) (300 $\mu\text{g}$ en 3 mL, absorción por peciolo)                                                   | 7 días                                             | Nerva <i>et al.</i> , 2020  |
| Vid ( <i>V. vinifera</i> )                                             | <i>Plasmopara viticola</i>     | DCL                                | Maquinaria de silenciamiento                                                        | 258 (DCL1), 257 (DCL2), 515 (DCL1/DCL2) (75, 100 o 125 ng $\mu\text{L}^{-1}$ )                                            | 14 días                                            | Haile <i>et al.</i> , 2021  |
| Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )                                          | <i>Magnaporthe oryzae</i>      | MoDES1                             | Efecto (patogenicidad)                                                              | 300 (MoDES1) 300 nM                                                                                                       | 10 días <sup>z</sup>                               | Sarkar y Roy-Barman, 2021   |
| Fresa ( <i>Fragaria vesca</i> ) en post cosecha                        | <i>Botryotinia fuckeliana</i>  | DCL, quitina sintasa clase III     | Maquinaria de silenciamiento, estructura de la pared celular                        | dsRNA encapsulado en células de <i>E. coli</i>                                                                            | 12 días                                            | Islam <i>et al.</i> , 2021  |
| Vid ( <i>V. vinifera</i> ) en post cosecha                             | <i>B. cinerea</i>              | BcCYP51, BcChs1, BcEF2             | Biosíntesis de ergosterol, quitina y factor de elongación                           | 732 (CYP51/Chs1/EF2)                                                                                                      | 3 días                                             | Nerva <i>et al.</i> , 2020  |
| Sin hospedante. Cultivo del hongo en medio sólido ( <i>in vitro</i> )  | <i>Macrophomina phaseolina</i> | $\beta$ -1,3-Glucano sintasa (GLS) | Enzima clave en la síntesis de $\beta$ -1,3 glucano, componente de la pared celular | siRNA (100 nM)                                                                                                            | 2.5 días                                           | Forster y Shuai, 2020       |
| Sin hospedante. Cultivo del hongo en medio líquido ( <i>in vitro</i> ) | <i>F. culmorum</i>             | CYP51A, CYP51B, CYP51C             | Biosíntesis de Ergosterol                                                           | 791 (20 ng $\mu\text{L}^{-1}$ )                                                                                           | 2 días                                             | Koch <i>et al.</i> , 2018   |

<sup>y</sup> Spray Induced gene Silencing. / Inducción de silenciamiento génico mediante dsRNA asperjados.

<sup>z</sup> The previous 48 h of treating with dsRNA were considered, along with the days of infection monitored. / Se consideraron las 48 h previas de tratamiento con dsRNA, más los días de infección monitoreados.

**Current limitations of SIGS in agriculture.** In the SIGS system, success depends on the sRNAs being able to permeabilize into the tissue of the host, which depends on the presence or absence of stomata, the thickness of the cuticle and the degree of suberization of the epidermis, as well as on the efficiency of absorption and the processing of the dsRNA by the pathogen (Hoffle *et al.*, 2020). Therefore, SIGS is effective on pathogens with an efficient absorption of dsRNAs and that have a functional iRNA machinery to process the sRNAs. Although this is a highly conserved process and present in most organisms, not all fungi have silencing mechanisms, an example being the basidiomycete *Ustilago maydis*. Likewise, it seems that iRNA is scarcely efficient in the control of *Zymoseptoria tritici*, one of the most devastating fungi for wheat (*T. aestivum*). Kettles and collaborators (2019) attempted to use HIGS to silence four key *Z. tritici* genes, but they were not successful, showing the inability of the fungus to absorb dsRNAs through the interaction with wheat. Later, Ma and collaborators (2020) reported that during the colonization of wheat by *Z. tritici*, they did not identify the presence of iRNA, therefore they concluded that the silencing mechanism does not participate in this infection. Despite *Z. tritici* maintaining the components of iRNA machinery, it does not seem to play a part in the infection of the host. This suggests that for the success of SIGS, it is crucial for a natural intercommunication to exist between the pathogen and the host via sRNA. Recently, Qiao and collaborators (2021) performed a test in which they used a fluorescent dsRNA to evaluate the ability of absorption of several fungi *in vitro*. They found that *Colletotrichum gloeosporioides* is unable to absorb them, whereas in *B. cinerea*, *V. dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* and *S. sclerotiorum*, the fluorescence was observed inside their cells after

susceptibles a la degradación y tienen muy poca persistencia en el ambiente (Bachman *et al.*, 2020), por lo que uno de los principales retos para su éxito en la agricultura es alargar su estabilidad en el ambiente.

**Factores que afectan el diseño de dsRNA para SIGS.** Uno de los principales factores que se debe considerar al diseñar los dsRNA son las propias dianas moleculares. Entre las dianas se han considerado desde las más convencionales; por ejemplo, genes que codifican enzimas que sintetizan intermediarios en la síntesis del lanosterol (Citocromo P450 lanosterol C-14 $\alpha$ -demetilasa, CYP51) (Koch *et al.*, 2016), silenciamiento de efectores (Sarkar y Roy-Barman, 2021) e incluso de los propios componentes del silenciamiento (Wang *et al.*, 2016) (Cuadro 2). Tanto en experimentos realizados *in vitro*, como en las aplicaciones sobre la superficie de las hojas, se ha observado que el efecto del silenciamiento incrementa al aumentar la dosis de los dsRNA (Haile *et al.*, 2021, McLoughlin *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2016); sin embargo, si la concentración es demasiado alta no se obtienen mejores resultados, lo que sugiere que la maquinaria de iRNA se satura y deja de procesar los dsRNA (McLoughlin *et al.*, 2018). En consecuencia, para lograr los mejores resultados con el SIGS, es necesario caracterizar cada patosistema y determinar la longitud y la concentración más adecuada de dsRNA, para conseguir el control de la enfermedad.

**Limitaciones actuales del SIGS en la agricultura.** En el sistema SIGS el éxito depende de que los sRNA puedan permeabilizar al interior del tejido del hospedante, lo cual depende de la presencia o ausencia de estomas, del grosor de la cutícula, y del grado de suberización de la epidermis; también depende de la eficiencia de absorción y del procesamiento de los dsRNA por parte del patógeno

6 h, indicating the internalization of the dsRNAs. Other microorganisms such as *Trichoderma virens* and *Phytophthora infestans* absorbed the dsRNA in a limited manner. Curiously, Mahto and collaborators (2020) silenced a *C. gloeosporioides* gene and control anthracnosis in chili pepper (*Capsicum annuum*) and tomato, where they used HIGS and proposed that the sRNA go through the haustorium of the fungus via extracellular vesicles secreted by the plant. However, it is important to remember that silencing via HIGS did not work in *Z. tritici* (Kettles *et al.*, 2019), suggesting that the entry methods of the iRNAs can vary between microorganisms, and in some cases, may not exist. For most phytopathogenic fungi, their abilities of absorption and processing of dsRNAs are unknown, therefore these tests must be broadened to better establish the potential of SIGS for the control of phytopathogenic fungi.

#### POTENTIAL OF INTERFERENCE RNA IN AGRICULTURAL CROPS IN MEXICO AND LATIN AMERICA

Latin America and the Caribbean (LAC) is an important food-producing region in the world. Its main agricultural products are cereals, oily seeds, banana, coffee, sugar, fruits and vegetables. In addition, 26% of the world's production of tropical fruit [banana (*M. acuminata*), mango (*Mangifera indica*), pineapple (*Ananas comosus*), avocado (*Persea americana*) and papaya (*Carica papaya*)] are grown in LAC, mainly in Brazil, Ecuador, Mexico and Costa Rica. LAC is an important exporting region and key in the world economy. For example, bananas and plantains (*M. balbisiana*) are among the most important food products in the world and their marketing is a cornerstone in the economies of many LAC countries. Despite this, their production

(Hoffle *et al.*, 2020). Por lo tanto, SIGS es efectivo sobre patógenos que tienen una eficiente absorción de las dsRNA y que poseen una maquinaria funcional de procesamiento de los sRNA. Aunque se trata de un proceso altamente conservado y presente en la mayoría de los organismos, no todos los hongos poseen maquinaria de silenciamiento, por ejemplo, el basidiomiceto *Ustilago maydis*. Asimismo, parece que el iRNA es poco eficiente para controlar a *Zymoseptoria tritici*, uno de los hongos más devastadores en los cultivos de trigo (*T. aestivum*). Kettles y colaboradores (2019) intentaron mediante HIGS silenciar cuatro genes claves de *Z. tritici*, pero ninguno fue exitoso, demostrando la incapacidad del hongo de absorber dsRNA a través de la interacción con trigo. Posteriormente, Ma y colaboradores (2020) reportaron que durante la colonización de trigo por *Z. tritici* no identificaron la presencia de iRNA, por lo que concluyeron que el mecanismo de silenciamiento no participa en esta infección. A pesar de que *Z. tritici* mantiene los componentes del iRNA, parece no tener un papel durante la infección del hospedante. Esto sugiere que para el éxito de SIGS es clave que exista una intercomunicación natural entre patógeno y hospedante por medio de sRNA. Recientemente Qiao y colaboradores (2021) realizaron un ensayo en el que usaron un dsRNA fluorescente para evaluar la capacidad de absorción de varios hongos *in vitro*. Encontraron que *Colletotrichum gloeosporioides* es incapaz de absorberlos, mientras que en *B. cinerea*, *V. dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *S. sclerotiorum* la fluorescencia se observó en el interior de sus células a las 6 h, lo que indica la internalización de los dsRNAs. Otros microorganismos como *Trichoderma virens* y *Phytophthora infestans* absorbieron los dsRNA de manera limitada. Curiosamente, Mahto y colaboradores (2020) lograron silenciar un gen de *C. gloeosporioides* y controlar la antracnosis en chile (*Capsicum annuum*) y

is constantly threatened by diverse diseases, mainly black Sigatoka (SN), caused by the ascomycete fungus *Pseudocercospora fijiensis*, and wilting from *Fusarium*, also known as the Panama disease. SN is a foliar disease that significantly reduces the rate of photosynthesis in the plant, weakening it and eventually killing it (Chí-Manzanero *et al.*, 2021). On the other hand, the Panama disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (Foc1), killed an entire Gros Michel banana crop, forcing farmers to change to a more resistant crop (cultivar Cavendish). However, with the appearance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc4), the banana industry is in grave danger. The urgent need to control this dangerous race of Foc has led to an evaluation of the technology of silencing using iRNA via HIGS (Ghag and Ganapathi, 2019). These authors developed transgenic banana lines that express iRNA against the *velvet* gene and the *Factor 1* of the transcription of Foc4, both genes related to growth, development and pathogenesis; the plants survived for six weeks and other for up to eight months without developing symptoms (Ghag *et al.*, 2014). Likewise, transgenic banana lines have been generated that have been able to silence the transcripts of enzyme C-24 sterol methyltransferase (ERG6) and of the cytochrome P450 lanosterol C-14 $\alpha$  dimethylase (ERG11), both of which are involved in the synthesis of ergosterol; both lines were evaluated for up to two years (Dou *et al.*, 2020).

In other crops, it has been estimated that global mango (*M. indica*) and avocado (*P. americana*) production will continue to grow in LAC. Brazil and Mexico are the most important mango and avocado producers, and of the latter, Mexico is the main exporter, while Colombia, the Dominican Republic and Peru have increased their production; LAC covers 73% of the world's avocado production, which highlights its importance in the agriculture in

jitomate donde emplearon HIGS y propusieron que los sRNA atraviesan el haustorio del hongo a través de vesículas extracelulares secretadas por la planta. Sin embargo, es importante recordar que el silenciamiento mediante HIGS no funcionó en *Z. tritici* (Kettles *et al.*, 2019), lo que sugiere que los métodos de ingreso de los iRNA pueden variar entre los microorganismos y en algunos casos no existir. Para la mayoría de los hongos fitopatógenos se desconocen sus capacidades de absorción y procesamiento de los dsRNAs, por lo que se requiere ampliar estas pruebas para establecer mejor el potencial de SIGS para el control de hongos fitopatógenos.

#### POTENCIAL DEL ARN DE INTERFERENCIA EN CULTIVOS AGRÍCOLAS DE MÉXICO Y AMÉRICA LATINA

América Latina y el Caribe (ALC) es una importante región productora de alimentos en el mundo. Sus principales productos agrícolas son cereales, semillas oleaginosas, banano, café, azúcar, frutas y verduras. Adicionalmente, 26% de la producción global de los principales frutos tropicales [bananas (*M. acuminata*), mango (*Mangifera indica*), piña (*Ananas comosus*), aguacate (*Persea americana*) y papaya (*Carica papaya*)] se cultivan en ALC, principalmente en Brasil, Ecuador, México y Costa Rica. ALC es una importante región exportadora y clave en la economía global. Por ejemplo, los bananos y los plátanos (*M. balbisiana*) se encuentran entre los productos alimenticios más importantes en el mundo y su comercialización es un pilar importante en la economía de muchos países de ALC. Sin embargo, su producción es constantemente amenazada por diversas enfermedades, entre las que destacan la Sigatoka negra (SN) cuyo agente causal es el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis*, y el marchitamiento por *Fusarium*, también llamado

the region. Among these tropical fruits, the disease anthracnose (*Colletotrichum* sp.) is common under post-harvest conditions. In mango and avocado, anthracnose is caused by *C. gloeosporioides* and this fungus attacks fruits in pre- and post-harvest, and also damages leaves. The evidence available in literature suggests that *C. gloeosporioides* does not efficiently absorb the exogenous dsRNAs (Qiao *et al.*, 2021). However, it has been proven that anthracnose in chili pepper and tomato may be controlled using HIGS (Mahto *et al.*, 2020), suggesting that the use of vesicles as carriers may be an alternative for the control via SIGS. One of the main pests that attack important crops in LAC is the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), a polyphagous pest that damages different crops, preferably maize, sorghum (*Sorghum bicolor*), cotton and soybean, onion, carrot (*Daucus carota*), lettuce, papaya, watermelon (*Citrullus lanatus*), melon (*Cucumis melo*), cucumber (*Cucumis sativus*), avocado, banana, rice, coffee (*Coffea arabica*), tomato, cacao (*Theobroma cacao*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), and many others (Montezano *et al.*, 2018). This pest is widely distributed in LAC and part of North America, and its larvae can cause losses of up to 100% of crops. Recently, Gurusamy and collaborators (2020a; 2020b) described the control of *S. frugiperda* via iRNA, using formulations of dsRNA with cationic lipids that protect the dsRNAs from degradation inside the insect, and make silencing more efficient (Gurusamy *et al.*, 2020a). Another report by the same authors evaluated the use of nanoparticles for the protection of the dsRNAs, preferring the formulations with chitosan due to its protective abilities and for being a biodegradable, non-toxic, cheap and eco-friendly polymer, meaning an improvement in the efficiency of silencing by SIGS (Gurusamy *et al.*, 2020b). Another important pest for LAC is the coffee berry borer (*Hypothenemus*

Mal de panamá. La SN es una enfermedad foliar que reduce significativamente la tasa de fotosíntesis en la planta, provocando su debilitamiento y eventualmente su muerte (Chí-Manzanero *et al.*, 2021). Por otro lado, el Mal de Panamá provocado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc1), acabó con el cultivo del banano Gros Michel, obligando a los productores a cambiar a un cultivo más resistente (cultivar Cavendish). Sin embargo, con la aparición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 (Foc4), la industria bananera corre un grave peligro. La urgente necesidad de controlar esta peligrosa raza de Foc ha llevado a evaluar la tecnología del silenciamiento por iRNA mediante HIGS (Ghag y Ganapathi, 2019). Estos autores desarrollaron líneas transgénicas de banano que expresan iRNA contra el gen *velvet* y el *Factor 1* de la transcripción de Foc4, ambos genes relacionados con el crecimiento, desarrollo y la patogénesis; estas plantas sobrevivieron seis semanas y algunas hasta ocho meses sin generar síntomas (Ghag *et al.*, 2014). Así mismo, se han generado líneas transgénicas de banano capaces de silenciar los transcritos de la enzima C-24 esterol metiltransferasa (ERG6) y del citocromo P450 lanosterol C-14 $\alpha$  dimetilasa (ERG11), ambas enzimas involucradas en la síntesis del ergosterol; ambas líneas fueron evaluadas hasta por dos años (Dou *et al.*, 2020).

En otros cultivos, se estima que la producción global de mango y aguacate seguirá creciendo en ALC. Brasil y México son los mayores productores de mango y aguacate, y de este último, México es el mayor exportador, mientras que Colombia, República Dominicana y Perú han aumentado su producción; ALC cubre el 73% de la producción global de aguacate en el mundo, lo que resalta su importancia en la agricultura de la región. Entre estos frutos tropicales, la enfermedad antracnosis (*Colletotrichum* sp.), es común en condiciones de post-cosecha. En mango y aguacate, la antracnosis

*hampei*). This insect is responsible for most of the losses in coffee in the world (Jaramillo *et al.*, 2006). The application of fragments of dsRNA in the preoral cavity of the borer larvae is effective for gene silencing, as well as the exogenous application for acquisition by ingestion (Aguilera *et al.*, 2011). Among the target genes evaluated, the best results were obtained by silencing the mannanases or xylanases involved in the hydrolysis of the main carbohydrates of the coffee grain (Aguilera *et al.*, 2011). The silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci*) is another important pest insect, widely distributed throughout LAC. This insect attacks avocado, bean (*Phaseolus vulgaris*), tomato, chili pepper and other crops, since it feeds from the phloem of plants, causing physiological disorders. In addition, it is a *Begomovirus* vector. To date, there have been reports of the silencing of several *B. tabaci* target genes via HIGS or artificial diets that contain dsRNA (Grover *et al.*, 2019), proving that the iRNA technology is a promising alternative for its control. However, there are still no reports of the evaluation in the field on the control of *B. tabaci* using any of these technologies, although the potential for their control using SIGS has recently been demonstrated, in combination with Mg-Fe layered double hydroxide nanoparticles (MgFe-LDH “Bioclay”) (Jain *et al.*, 2022). Likewise, the potential of homologous sequences derived from the *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) and heterologous derived from the *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) has been proven, opening the possibility of protection against the *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Medina-Hernández *et al.*, 2013; Vargas-Salinas *et al.*, 2021). Despite being promising for an integrated and eco- and human-friendly management, the potential of the dsRNAs, and particularly of SIGS, in the agriculture of LAC is unknown.

In Mexico, iRNA have been used in the application of VIGS to study plant genes. Álvarez-

es causada por *C. gloeosporioides* y este hongo ataca al fruto en pre- y post-cosecha, y también causa daño foliar. La evidencia disponible en la literatura sugiere que *C. gloeosporioides* no absorbe eficientemente los dsRNA exógenos (Qiao *et al.*, 2021). Sin embargo, se ha demostrado que la antracnosis en chile y jitomate puede ser controlado por medio de HIGS (Mahto *et al.*, 2020), lo que sugiere que el uso de vesículas como acarreadores pudiera ser una alternativa para el control por SIGS. Entre las plagas que atacan cultivos de importancia en ALC destaca el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), una plaga polífaga que daña diferentes cultivos vegetales, preferentemente a maíz, sorgo (*Sorghum bicolor*), algodón y soya, cebolla, zanahoria (*Daucus carota*), lechuga, papaya, sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo*), pepino (*Cucumis sativus*), aguacate, banana, arroz, café (*Coffea arabica*), jitomate, cacao, caña de azúcar, entre muchos otros (Montezano *et al.*, 2018). Esta plaga se encuentra ampliamente distribuida en ALC y parte de Norte América y sus larvas pueden ocasionar pérdidas de hasta el 100% en los cultivos. Recientemente Gurusamy y colaboradores (2020a; 2020b) describieron el control de *S. frugiperda* mediante iRNA, empleando formulaciones de dsRNA con lípidos catiónicos que protegen los dsRNA de la degradación en el interior del insecto y eficientizan el silenciamiento (Gurusamy *et al.*, 2020a). En otro reporte, los mismos investigadores evaluaron el uso de nanopartículas para la protección de los dsRNA, ponderando las formulaciones con quitosano por su capacidad de protección y por ser un polímero biodegradable, no tóxico, económico y seguro con el ambiente, demostrando una mejora en la eficiencia del silenciamiento por SIGS (Gurusamy *et al.*, 2020b). Otra plaga de gran importancia en ALC es la broca de café (*Hypothenemus hampei*). Este insecto es responsable de las mayores pérdidas en el cultivo de café en el mundo (Jaramillo *et al.*, 2006). La aplicación de fragmentos de dsRNA en

Venegas *et al.* (2011) silenced genes related to flowering in canola (*B. napus*) and they obtained plants that flower without vernalization. In another study, Villanueva-Hernández *et al.* (2013), created a VIGS vector using an isolated *Begomovirus* in Yucatán in plants of the *Euphorbia* genus, which they called pEuMV-YP, with which they silenced ChII as a reporter gene to evaluate the functionality of the VIGS vector. ChII encodes a protein that protects chlorophyll and its silencing generates a photobleaching phenotype. The authors showed that pEuMV-YP is adequate for silencing genes in *N. benthamiana* and *C. annuum* plants. Similarly, Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo (2020) created a viral vector based on the Tobacco rattle virus (TRV), in which they incorporated a Gateway technology cassette in order to clone in it the DNA by recombination and they also incorporated the T-ADN region of *A. tumefaciens* to introduce the VIGS construct via agroinfiltration. This VIGS was used as a proof of concept to silence the gene that encodes the phytoene desaturase in chili pepper, which reduced the synthesis of phytoene, a precursor of the carotenes, and generated a phenotype of photobleaching in the leaves. Recently, Villanueva-Hernández *et al.* (2022) used pEuMV-YP to express in *N. benthamiana* an siRNA against the Krt18 gene in mice (*Mus musculus*), showing that the expression in plants mediated by VIGS can be used to silence genes in different kingdoms, in this case, from plants to mammals. We naturally consume small RNAs from some plants that we use as food or medications. For example, in China, the *Lonicera japonica* plant is used against influenza A and the SARS-CoV-2 virus, and its active ingredient has been proven to be a small RNA, miRNA-type, miRNA2911 (Zhou *et al.*, 2015; 2020), therefore the production in plants of dsRNA directed against human pathogens can be of medical interest, although there are many

la cavidad preoral de las larvas de la broca es efectiva para el silenciamiento génico, al igual que la aplicación exógena para la adquisición por ingestión (Aguilera *et al.*, 2011). Entre los genes diana evaluados, los mejores resultados fueron obtenidos silenciando las mananases o xilanasas involucradas en la hidrólisis de los principales carbohidratos del grano de café (Aguilera *et al.*, 2011). La mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) es otro insecto plaga importante, ampliamente distribuida por toda ALC. Este insecto afecta cultivos de aguacate, frijol (*Phaseolus vulgaris*), jitomate, chile y otras hortalizas; al alimentarse del floema de las plantas, provocando desórdenes fisiológicos. Adicionalmente, es vector de *Begomovirus*. A la fecha se ha reportado el silenciamiento de numerosos genes diana de *B. tabaci* a través de HIGS o de dietas artificial que contenga dsRNA (Grover *et al.*, 2019), demostrando que la tecnología del iRNA es una alternativa prometedora para su control. Sin embargo, aún no hay reportes de la evaluación en campo del control de *B. tabaci* con alguna de estas tecnologías, aunque recientemente se ha demostrado el potencial de control mediante SIGS, en combinación con nanopartículas de doble hidróxido en capas de MgFe (MgFe-LDH “Bioclay”) (Jain *et al.*, 2022). Así mismo se ha reportado el potencial de secuencias homólogas derivadas del virus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y heterólogas derivadas de *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV), abriendo las posibilidades de protección contra *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Medina-Hernández *et al.*, 2013; Vargas-Salinas *et al.*, 2021). A pesar de ser promisorios para un manejo integrado y amigable para el medio ambiente y humano, aún se desconoce el potencial de los dsRNAs y en particular de SIGS en la agricultura de ALC.

En México, se han empleado iRNA en el uso de VIGS para estudiar genes vegetales. Álvarez-Venegas *et al.* (2011) silenciaron genes relacionados con la



points still to solve, such as the low stability of sRNAs and reaching a sufficient concentration for it to be therapeutic. Although the number of studies on the silencing in plants or phytopathogens in Mexico is still limited, the methodological tools that have been created help expect that the number of investigations in this field continue to increase.

### CHALLENGES TO ESTABLISH SIGS IN THE FIELD

The potential of the iRNAs in tropical crops using the strategy of producing transgenic plant (HIGS) has been evaluated in several investigations. Although results have been promising, there are limitations in the legislations of most LAC countries for the agronomic use of genetically modified materials. However, the results have revealed the potential of iRNA to control, for example, Foc4, and pave the way for the evaluation of non-transgenic alternatives, SIGS (Dou *et al.*, 2020; Ghag *et al.*, 2014; Koch *et al.*, 2019; Koch and Wassenegger, 2021; Mahto *et al.*, 2020; Montezano *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2017).

In order to successfully protect plants and post-harvest fruits of agronomic interest using SIGS, the functionality of the dsRNAs in the plant-pathogen interaction must be studied. One of the challenges is the construction of nanovehicles that protect and extend the stability of the dsRNAs, which must be innocuous to humans and other living beings, as well as biodegradable. A nanoparticle that has these characteristics is bioclay, a layered double hydroxide clay that forms nanofilms, that nanoencapsulates the dsRNAs and keeps them stable for up to 20 days (Gebremichael *et al.*, 2021). It was initially developed as a form of plant protection against phytopathogenic viruses, but it is currently being evaluated for protection against fungal diseases

floración en canola (*B. napus*) y obtuvieron plantas que florecen sin vernalización. En otro trabajo, Villanueva-Hernández *et al.* (2013), crearon un vector VIGS empleando un *Begomovirus* aislado en Yucatán en plantas del género *Euphorbia*, al que le llamaron pEuMV-YP y con el que silenciaron ChII como gen reportero para evaluar la funcionalidad del vector VIGS; ChII codifica una proteína que protege la clorofila, y su silenciamiento genera un fenotipo de fotoblanqueo. Los autores demostraron que pEuMV-YP es adecuado para silenciar genes en plantas de *N. benthamiana* y de *C. annuum*. Similarmente, Arce-Rodríguez y Ochoa-Alejo (2020), crearon un vector viral basado en el virus del sonajero del tabaco (*Tobacco rattle virus*, TRV), al que le incorporaron un casete de tecnología Gateway para clonar en él, el ADN mediante recombinación, y también le incorporaron la región T-ADN de *A. tumefaciens* para introducir el constructo VIGS mediante agroinfiltración. Como prueba de concepto se utilizó este vector VIGS para silenciar el gen que codifica la fitoeno desaturasa en chile, lo que disminuyó la síntesis de fitoeno, un precursor de los carotenos, y generó un fenotipo de fotoblanqueo en las hojas. Recientemente, Villanueva-Hernández *et al.* (2022), usaron el pEuMV-YP para expresar en *N. benthamiana* un siRNA contra el gen Krt18 de ratón (*Mus musculus*), demostrando que la expresión en planta mediada por VIGS puede ser usada para silenciar genes en organismos de diferentes reinos, en este caso, de plantas a mamíferos. De manera natural, consumimos ARNs pequeños de algunas plantas que usamos como alimentos o medicinas. Por ejemplo, en China, se usa la planta *Lonicera japonica* para combatir la influenza A y el virus SARS-CoV-2 y se ha demostrado que su principio activo es un ARN pequeño de tipo miRNA, el miRNA2911 (Zhou *et al.*, 2015; 2020), por lo que la producción dirigida de dsRNA en plantas contra patógenos de humanos puede ser de interés

in plants. Another challenge to overcome is the improvement of the absorption of the dsRNAs in the fungi that have silencing machinery, but are recalcitrant, such as *C. glosporoides*. As well as finding more profitable dsRNA production costs. The next investigations should focus on solving these challenges to turn SIGS from a promise into a reality. The normativity also requires work, so that it can eventually become a commercial technology.

## PERSPECTIVES OF SIGS

It is important to focus efforts on overcoming the technical limitations of SIGS, since its perspective is huge. The selection of possible targets is very broad. Practically any gene involved in the viability or the pathogenicity of an organism is susceptible of being a target, and the ease of production of dsRNAs makes this technology friendly for large-scale studies. Its nearest commercial applications are the control of plant and human disease vector insects (Castellanos *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Zotti *et al.*, 2018), the control of post-harvest fruit and vegetable diseases (de Oliveira *et al.*, 2021; Qiao *et al.*, 2021) and the control of weeds (Zabala-Pardo *et al.*, 2022), because there are already reports that prove the conditions under which they can be effective for these cases.

## CONCLUSIONS

The iRNA technology has great potential for the control of pests and diseases caused by fungi, particularly the SIGS strategy, the use of which is safe and eco-friendly. Further investigations in this direction on the agronomically important pathosystems in Mexico and Latin America is crucial to create a catalogue of the pathogens that can be controlled using SIGS.

médico, aunque todavía quedan muchos puntos por resolver como la baja estabilidad de los sRNAs y alcanzar una concentración suficiente que sea terapéutica. Aunque aún es limitado el número de trabajos de silenciamiento en plantas o fitopatógenos en México, las herramientas metodológicas que se han ido construyendo permiten esperar que las investigaciones en este campo vayan en aumento.

## DESAFÍOS PARA ESTABLECER SIGS EN EL CAMPO

Se ha evaluado el potencial de los iRNA en los cultivos tropicales utilizando la estrategia de generación de plantas transgénicas (HIGS); aunque los resultados han sido prometedores, se tiene limitaciones en las legislaciones de la mayoría de los países en ALC para el uso agronómico de materiales genéticamente modificados. Sin embargo, los resultados han revelado el potencial del iRNA para controlar por ejemplo, a Foc4, y abren camino para evaluar la alternativa no transgénica, el SIGS (Dou *et al.*, 2020; Ghag *et al.*, 2014; Koch *et al.*, 2019; Koch y Wassenegger, 2021; Mahto *et al.*, 2020; Montezano *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2017).

Para conseguir una exitosa protección de plantas y frutos en post-cosecha de interés agronómico mediante el uso de SIGS, se requiere estudiar la funcionalidad de los dsRNA en la interacción planta-patógeno. Uno de los desafíos es construir nanovehículos que protejan y alarguen la estabilidad de los dsRNA, y que sean inocuos para el hombre y demás seres vivos, además de ser biodegradables. Una nanopartícula que cumple estas características es una arcilla de doble hidróxido que forma nanoláminas en capas (llamada “bioclay”), que nanoencapsula los dsRNA y los mantiene estables hasta 20 días (Gebremichael *et al.*, 2021). Fue inicialmente desarrollada para conferir protección contra virus

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was funded by the National Humanities, Sciences and Technologies Council (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías - CONAHCyT), with projects FOSEC-SEP 220957, and FOP16-2021-01 No. 320993, and grant #644399 to OJCD and #700673 to KGCA.

**LITERATURE CITED**

- Aguilera GC, Padilla E, Flórez CP, Rubio JD y Acuña JR. 2011. ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (coleoptera: Scolytinae). Revista Colombiana de Entomología 37(2): 167–172. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-04882011000200001&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-04882011000200001&script=sci_arttext&tlng=es)
- Álvarez-Venegas R, Zhang Y, Kraling Konrad and Tulsieram L. 2011. Flowering without vernalization in winter canola (*Brassica napus*): use of Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) to accelerate genetic gain. Nova scientia 3(5): 29-50. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-07052011000100003&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052011000100003&lng=es&tlng=en)
- Arce-Rodríguez M and Ochoa-Alejo N. 2020. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) in Chili Pepper (*Capsicum* spp.). Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2172: 27–38. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0751-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0751-0_3)
- Brito FSD, Santos JRP, Azevedo VCR, Peixoto YS, de Oliveira SA, Ferreira CF, Haddad F, Amorim EP, Fraaije B and Miller RNG. 2020. Genetic diversity and azole fungicide sensitivity in *Pseudocercospora musae* field populations in Brazil. Frontiers in Microbiology 11(99): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00099>
- Cai Q, He B, Kogel KH and Jin H. 2018. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi-nature's blueprint for modern crop protection strategies. Current opinion in microbiology 46: 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.003>
- Castellanos NL, Smagghe G, Sharma R, Oliveira EE and Christiaens O. 2019. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. Pest. Management Science 75: 537–548. doi: 10.1002/ps.5167
- Chí-Manzanero B, Carreón-Anguiano KG, Todd JNA, Góme-Tah R, Grijalva-Arango R, Tzec- Simá MA and Canto-Canché B. 2021. Analysis of *Pseudocercospora fijiensis* genes upregulated during early interaction with *Musa acuminata* (var. dwarf cavendish). Bionatura 6(1): 1540–1546. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.15>
- Dalakouras A, Jarausch W, Buchholz G, Bassler A, Braun M, Manthey T, Krczal G and Wassenecker M. 2018. Delivery of hairpin rnas and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. Frontiers in Plant Science 9: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01253>

fitopatógenos, pero actualmente se está evaluando para protección vegetal contra enfermedades fúngicas. Otro reto por superar es mejorar la absorción de los dsRNA en los hongos que sí poseen la maquinaria de silenciamiento, pero que resultan recalcitrantes, como *C. glosporoides*. Así como obtener costos más rentables de producción de los dsRNAs. Las próximas investigaciones deberán enfocarse en resolver estos retos para llevar a SIGS de promesa a realidad. También se requiere trabajar en la normatividad, para que eventualmente pueda llegar a ser una tecnología comercial.

**PERSPECTIVAS DE LA SIGS**

Es importante enfocar los esfuerzos para superar las limitantes técnicas de SIGS, pues su perspectiva es enorme. La selección de posibles dianas es muy amplia; prácticamente cualquier gen involucrado en la viabilidad o en la patogenicidad de un organismo es susceptible de ser diana, y la facilidad de producción de los dsRNA hace que esta tecnología sea amigable para estudios en alta escala. Sus aplicaciones comerciales más cercanas son el control de insectos vectores de enfermedades de plantas y humanos (Castellanos *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Zotti *et al.*, 2018), el control de enfermedades de frutos post-cosecha (de Oliveira *et al.*, 2021; Qiao *et al.*, 2021) y el control de malezas (Zabala-Pardo *et al.*, 2022), porque ya existen reportes que evidencian bajo qué condiciones pueden ser efectivos en estos casos.

**CONCLUSIONES**

La tecnología del iRNA tiene gran potencial para el control de plagas y enfermedades causadas por hongos, en particular la estrategia SIGS, cuya

- Dalakouras A, Wassenegeger M, Dadami E, Ganopoulos I, Pappas ML and Papadopoulou K. 2020. Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiology* 182: 1–13. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- de Oliveira-Filho JG, Silva GDC, Cipriano L, Gomes M and Egea MB. 2021. Control of postharvest fungal diseases in fruits using external application of RNAi. *Journal of Food Science* 86(8): 3341–3348. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15816>
- Dou T, Shao X, Hu C, Liu S, Sheng O, Bi F, Deng G, Ding L, Li C, Dong T, Gao H, He W, Peng X, Zhang S, Huo H, Yang Q and Yi G. 2020. Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. *Plant Biotechnology Journal* 18: 11–13. <https://doi.org/10.1111/pbi.13204>
- Fletcher SJ, Reeves PT, Hoang BT and Mitter N. 2020. A perspective on RNAi-based biopesticides. *Frontiers in Plant Science* 11: 51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>
- Forster H and Shuai B. 2020. RNAi-mediated knockdown of  $\beta$ -1,3-glucan synthase suppresses growth of the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 110: 101486. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101486>
- Gaffar FY, Imani J, Karlovsky P, Koch A and Kogel KH. 2019. Different components of the RNA interference machinery are required for conidiation, ascosporeogenesis, virulence, deoxynivalenol production, and fungal inhibition by exogenous double-stranded rna in the head blight pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology* 10: 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01662>
- García-Ruiz H, Ruiz M, Peralta S, Gabriel C and El-Mounadi K. 2016. Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3): 286–307. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-8>
- Ghag SB and Ganapathi TR. 2019. RNAi-mediated protection against banana diseases and pests. *3 Biotech* 9(3): 112. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1650-7>
- Ghag SB, Shekhawat UKS and Ganapathi TR. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against Fusarium wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal* 12: 541–553. <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
- Grover S, Jindal V, Banta G, Taning CNT, Smagghe G and Christiaens O. 2019. Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 100(2): 1–17. <https://doi.org/10.1002/arch.21522>
- Gurusamy D, Mogilicherla K and Palli SR. 2020. Chitosan nanoparticles help double-stranded RNA escape from endosomes and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104(4): 1–15. <https://doi.org/10.1002/arch.21677>
- Gurusamy D, Mogilicherla K, Shukla JN and Palli SR. 2020. Lipids help double-stranded RNA in endosomal escape and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104(4): 1–19. <https://doi.org/10.1002/arch.21678>

aplicación es segura y ecoamigable. Es crucial desarrollar investigaciones en esta dirección sobre los patosistemas de importancia agronómica en México y Latinoamérica, para crear un catálogo de los patógenos que pueden ser controlados por SIGS.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), con los Proyectos FOSEC-SEP 220957, y FOP16-2021-01 No. 320993, y la beca #644399 a OJCD y #700673 a KGCA.

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

- Haile ZM, Gebremichael DE, Capriotti L, Molesini B, Negrini F, Collina M, Sabbadini S, Mezzetti B and Baraldi E. 2021. Double-stranded RNA targeting dicer-like genes compromises the pathogenicity of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Frontiers in Plant Science* 12: 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667539>
- Halder K, Chaudhuri A, Abdin MZ, Majee M and Datta A. 2022. RNA interference for improving disease resistance in plants and its relevance in this clustered regularly interspaced short palindromic repeats-dominated era in terms of dsrna-based biopesticides. *Frontiers in plant science* 13: 885128. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.885128>
- Höfle L, Biedenkopf D, Werner B. T, Shrestha A, Jelonek L and Koch A. 2020. Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the Fusarium CYP51 genes. *RNA Biology* 17(4): 463–473. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700033>
- Hudzik C, Hou Y, Ma W and Axtell MJ. 2020. Exchange of small regulatory RNAs between plants and their pests. *Plant Physiology* 182: 51–62. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00931>
- Islam MT, Davis Z, Chen L, Englaender J, Zomorodi S, Frank J, Bartlett K, Somers E, Carballo SM, Kester M, Shakeel A, Pourtaheri P and Sherif SM. 2021. Minicell-based fungal RNAi delivery for sustainable crop protection. *Microbial Biotechnology* 14(4): 1847–1856. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13699>
- Jain RG, Fletcher SJ, Manzie N, Robinson KE, Li P, Lu E, Brosnan CA, Xu ZP and Mitter N. 2022. Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. *Nature Plants* 8(5): 535–548. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01152-8>

- Jaramillo J, Borgemeister C and Baker P. 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research* 96(3): 223–233. <https://doi.org/10.1079/ber2006434>
- Jensen PD, Zhang Y, Wiggins BE, Petrick JS, Zhu J, Kerstetter RA, Heck GR and Ivashuta SI. 2013. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food* 4(2): 90–97. <https://doi.org/10.4161/gmcr.25285>
- Jian J and Liang X. 2019. One small RNA of *Fusarium graminearum* targets and silences CEBiP gene in common wheat. *Microorganisms* 7(10): 425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100425>
- Jin Y, Zhao JH, Zhao P, Zhang T, Wang Sand Guo HS. 2019. A fungal miRNA mediates epigenetic repression of a virulence gene in *Verticillium dahliae*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 374(1767): 20180309. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0309>
- Kaldis A, Berbati M, Melita O, Reppa C, Holveva M, Otten P and Voloudakis A. 2018. Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. *Molecular Plant Pathology* 19(4): 883–895. <https://doi.org/10.1111/mpp.12572>
- Kettles GJ, Hofinger BJ, Hu P, Bayon C, Rudd JJ, Balmer D, Courbot M, Hammond-Kosack K E, Scalliet G and Kanyuka K. 2019. sRNA profiling combined with gene function analysis reveals a lack of evidence for cross-kingdom RNAi in the wheat – *Zymoseptoria tritici* pathosystem. *Frontiers in Plant Science* 10: 892. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00892>
- Kiselev KV, Suprun AR, Aleynova OA, Ogneva ZV and Dubrovina AS. 2021. Physiological conditions and dsRNA application approaches for exogenously induced RNA interference in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* 10(264): 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10020264>
- Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L, Rossbach O, Abdellatif E, Linicus L, Johannsmeier J, Jelonek L, Goesmann A, Cardoza V, McMillan J, Mentzel T and Kogel KH. 2016. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathogens* 12(10): 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
- Koch A, Höfle L, Werner BT, Imani J, Schmidt A, Jelonek L and Kogel KH. 2019. SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium* FgCYP51 genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology* 20(12): 1636–1644. <https://doi.org/10.1111/mpp.12866>
- Koch A, Stein E and Kogel KH. 2018. RNA-based disease control as a complementary measure to fight *Fusarium* fungi through silencing of the azole target Cytochrome P450 Lanosterol C-14 α -Demethylase. *European Journal of Plant Pathology* 152(4): 1003–1010. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1518-4>
- Koch A and Wassenegger M. 2021. Host-induced gene silencing – mechanisms and applications. *New Phytologist* 231(1): 54–59. <https://doi.org/10.1111/nph.17364>
- Lax C, Tahiri G, Patiño-Medina JA, Cánovas-Márquez JT, Pérez-Ruiz JA, Osorio-Concepción M, Navarro E and Calo S. 2020. The evolutionary significance of RNAi in the fungal kingdom. *International Journal of Molecular Science* 21(24): 9348. <https://doi.org/10.3390/ijms21249348>. PMID: 33302447; PMCID: PMC7763443
- Li C and Zamore PD. 2019. Preparation of dsRNAs for RNAi by *in vitro* transcription. *Cold Spring Harbor protocols* (3). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot097469>
- Ma X, Wiedmer J and Palma-Guerrero J. 2020. Interaction between wheat and *Zymoseptoria tritici*. Small RNA bidirectional crosstalk during the interaction between wheat and *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science* 10: 1669. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01669>
- Mahto BK, Singh A, Pareek M, Rajam MV, Dhar-Ray S and Reddy PM. 2020. Host-induced silencing of the *Colletotrichum gloeosporioides* conidial morphology 1 gene (CgCOM1) confers resistance against Anthracnose disease in chilli and tomato. *Plant Molecular Biology* 104: 381–395. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01046-3>
- Majumdar R, Rajasekaran K and Cary JW. 2017. RNA Interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science* 8(200): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00200>
- McLoughlin AG, Wytinck N, Walker PL, Girard IJ, Rashid KY, De Kievit T, Fernando WGD, Whyard S and Belmonte MF. 2018. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports* 8: 7320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25434-4>
- Medina-Hernández D, Rivera-Bustamante RF, Tenllado F and Holguín-Peña RJ. 2013. Effects and effectiveness of two RNAi constructs for resistance to pepper golden mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants. *Viruses* 5(12): 2931–2945. <https://doi.org/10.3390/v5122931>
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Peterson JA and Hunt TE. 2018. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology* 26(2): 286–300. <https://doi.org/doi.org/10.4001/003.026.0286>
- Nerva L, Sandrini M, Gambino G and Chitarra W. 2020. Double-stranded RNAs (dsRNAs) as a sustainable tool against gray mold (*Botrytis cinerea*) in grapevine: effectiveness of different application methods in an open-air environment. *Biomolecules* 10(2): 200. <https://doi.org/10.3390/biom10020200>
- Papadopoulou N, Devos Y, Álvarez-Alfageme F, Lanzoni A and Waigmann E. 2020. Risk assessment considerations for genetically modified RNAi plants: EFSA's activities and perspective. *Frontiers in Plant Science* 11: 445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00445>
- Parker JE, Warrilow AGS, Price CL, Mullins JGL, Kelly DE and Kelly SL. 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology* 7(4): 143–161. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>
- Qi T, Guo J, Peng H, Liu P, Kang Z and Guo J. 2019. Host-induced gene silencing: a powerful strategy to control diseases of wheat and barley. *International Journal of Molecular Sciences* 20(206): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20010206>

- Qi T, Zhu X, Tan C, Liu P, Guo J, Kang Z and Guo J. 2018. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnology Journal* 16(3): 797–807. <https://doi.org/10.1111/pbi.12829>
- Qiao L, Lan C, Capriotti L, Ah-Fong A, Nino Sanchez J, Hamby R, Heller J, Zhao H, Glass NL, Judelson HS, Mezzetti B, Niu D and Jin H. 2021. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal* 19(9): 1756–1768. <https://doi.org/10.1111/pbi.13589>
- Rodrigues TB and Petrick JS. 2020. Safety considerations for humans and other vertebrates regarding agricultural uses of externally applied RNA molecules. *Frontiers in Plant Science* 11: 407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00407>
- Rosa C, Kuo Y, Wuriyanghan H and Falk BW. 2018. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology* 56: 581–610.
- Sang H and Kim JI. 2020. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnology Reports* 14: 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3>
- Sarkar A and Roy-Barman S. 2021. Spray-induced silencing of pathogenicity gene MoDES1 via exogenous double-stranded RNA can confer partial resistance against fungal blast in rice. *Frontiers in Plant Science* 12: 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.733129>
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N and Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* 3(3): 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Sun G and Riggs AD. 2017. A Simple and cost-effective approach for *in vitro* production of sliced siRNAs as potent triggers for RNAi. *Molecular therapy. Nucleic acids* 8: 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.008>
- Taning CNT, Arpaia S, Christiaens O, Dietz-Pfeilstetter A, Jones H, Mezzetti B, Sabbadini S, Sorteberg HG, Sweet J, Ventura V and Smagghe G. 2020. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science* 76(3): 841–845. <https://doi.org/10.1002/ps.5686>
- Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Couoh-Dzul OJ, de los Santos-Briones C and Blondy Canto-Canché. 2023. Effectors: key actors in phytopathology. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(2): 203–228. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-4>
- van Dijk M, Morley T, Rau ML and Saghai Y. 2021. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food* 2(7): 494–501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>
- Vargas-Salinas M, Medina-Hernández D, Arcos-Ortega GF, Luis-Villaseñor IE and Holguín-Peña RJ. 2021. RNAi activation with homologous and heterologous sequences that induce resistance against the begomovirus Pepper golden mosaic virus (PepGMV). *3 Biotech* 11(3): 1–19. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02653-7>
- Villanueva-Alonzo HJ, Haro-Álvarez AP, Alvarado-Segura AA, Valle-Gough RE, Collí-Mull JG, Cal-Torres A, Arana-Argáez VE, Torres-Romero JC, Moreno-Valenzuela OA, Nic-Can G, Ayil-Gutiérrez BA and Acosta-Viana KY. 2022. A method to produce vsiRNAs in plants with cross-kingdom gene silencing capacity. *Applied Sciences* 12(11): 5329. <https://doi.org/10.3390/app12115329>
- Villanueva-Alonzo HJ, Us-Camas RY, López-Ochoa LA, Robertson D, Guerra-Peraza O, Minero-García Y and Moreno-Valenzuela OA. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology letters* 35(5): 811–823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>
- Wang M and Jin H. 2017. Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. *Trends in Microbiology* 25(1): 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>
- Wang B, Sun Y, Song N, Zhao M, Liu R, Feng H, Wang X and Kang Z. 2017. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-miR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *The New phytologist* 215(1): 338–350. <https://doi.org/10.1111/nph.14577>
- Wang M, Weiberg A, Lin FM, Thomma BPHJ, Huang H and Jin H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants* 2: 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang HD and Jin H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342(6154): 118–123. <https://doi.org/10.1126/science.1239705>
- Werner BT, Gaffar FY, Schuemann J, Biedenkopf D and Koch AM. 2020. RNA-spray-mediated silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL genes improve barley disease resistance. *Frontiers in Plant Science* 11(476): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- Werner BT, Koch A, Šečić E, Engelhardt J, Jelonek L, Steinbrenner J and Kogel KH. 2021. *Fusarium graminearum* DICER-like-dependent sRNAs are required for the suppression of host immune genes and full virulence. *PLoS One* 16(8): e0252365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252365>. PMID: 34351929; PMCID: PMC8341482
- Yin C and Hulbert S. 2015. Host Induced Gene Silencing (HIGS), a promising strategy for developing disease resistant crops. *Gene Technology* 4(3): 1–2. <https://doi.org/10.4172/2329-6682.1000130>
- Yin C, Jurgenson JE and Hulbert SH. 2011. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(5): 554–561. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0229>
- Yin C, Zhu H, Jiang Y, Shan Y and Gong L. 2020. Silencing Dicer-like genes reduces virulence and sRNA generation in *Penicillium italicum*, the cause of citrus blue mold. *Cells* 9(2): 363. <https://doi.org/10.3390/cells9020363>

- Xu M, Guo Y, Tian R, Gao C, Guo F, Voegelé RT, Bao J, Li C, Jia C, Feng H and Huang L. 2020. Adaptive regulation of virulence genes by microRNA-like RNAs in *Valsa mali*. *The New phytologist* 227(3): 899–913. <https://doi.org/10.1111/nph.16561>
- Xu M, Li G, Guo Y, Gao Y, Zhu L, Liu Z, Tian R, Ga, C, Han P, Wang N, Guo F, Bao J, Jia C, Feng H and Huang L. 2022. A fungal microRNA-like RNA subverts host immunity and facilitates pathogen infection by silencing two host receptor-like kinase genes. *The New phytologist* 233(6): 2503–2519. <https://doi.org/10.1111/nph.17945>
- Zabala-Pardo D, Gaines T, Lamego FP and Avila LA. 2022. RNAi as a tool for weed management: challenges and opportunities. *Advance in Weed Science* 40(spe1): <https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2022;40:seventy-five006>
- Zanini S, Šečić E, Busche T, Galli M, Zheng Y, Kalinowski J and Kogel KH. 2021. Comparative analysis of transcriptome and sRNAs expression patterns in the *Brachypodium distachyon*-*Magnaporthe oryzae* pathosystems. *International journal of molecular sciences* 22(2): 650. <https://doi.org/10.3390/ijms22020650>
- Zeng J, Gupta VK, Jiang Y, Yang B, Gong L and Zhu H. 2019. Cross-kingdom small rnas among animals, plants and microbes. *Cells* 8(4): 371. <https://doi.org/10.3390/cells8040371>
- Zheng Y, Hu Y, Yan S, Zhou H, Song D, Yin M and Shen J. 2019. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Management Science* 75(7): 1993–1999. <https://doi.org/10.1002/ps.5313>
- Zhou Z, Li X, Liu J, Dongxia H, Chen Q, Liu J, Kong H, Zhang Q, Qianyi Z, Hou D, Zhang L, Zhang G, Liu Y, Zhang Y, Li J, Wang J, Chen X, Wang H, Zhang J, Chen H and Zhang CY. 2015. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Research* 25: 39–49. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.130>
- Zhou LK, Zhou Z, Jiang XM, Zheng Y, Chen X, Fu Z, Xiao G, Zhang CY, Zhang LK and Yi Y. 2020. Absorbed plant MIR2911 in honeysuckle decoction inhibits SARS-CoV-2 replication and accelerates the negative conversion of infected patients. *Cell discovery* 6(1): 54. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00197-3>
- Zhu L, Zhu J, Liu Z, Wang Z, Zhou C and Wang H. 2017. Host-induced gene silencing of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* pathogenicity genes mediated by the brome mosaic virus. *Genes* 8(10): 241. <https://doi.org/10.3390/genes8100241>
- Zotti M, Avila dos Santos E, Cagliari D, Christiaens O, Tizi Taning CN and Smagghe G. 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science* 74: 1239–1250. <https://doi.org/10.1002/ps.4813>
- Zotti ., Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT and Smagghe G. 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science* 74: 1239–1250. <https://doi.org/10.1002/ps.4813>

In vitro antagonism of *Trichoderma* against *Rhizoctonia solani*

Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia solani*

Jesús Orlando Pérez-González, ¹Agricultura Sustentable y Protegida, Universidad Tecnológica del Sur del Estado de Morelos (UTSEM). Carr. Puente de Ixtla-Mazatepec km 2.35, CP 62665, Puente de Ixtla, Mor., México; **Sergio Gavino Ramírez-Rojas**^{*}, ²Programa de Sanidad Forestal y Agrícola, Campo Experimental “Zacatepec”, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Carr. Zacatepec-Galeana km 0.5, CP 62780, Zacatepec, Mor., México; **Ramiro Rocha-Rodríguez**, Campo Experimental “Bajío”, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Carr. Celaya-San Miguel Allende km 6.5, CP 38110, Celaya, Gto, México; ²**Katya Ornelas-Ocampo**; ²**Jorge Miguel Paulino Vázquez-Alvarado**; **Filogonio Jesús Hernández-Guzmán**, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Tepatepec, CP 42660, Francisco I. Madero, Hidalgo, México; ¹**Mariel Garduño-Audelo**.

*Corresponding author: sergioinifap@yahoo.com.mx

Received: April 16, 2023.

Accepted: August 18, 2023.

Pérez-González JO, Ramírez-Rojas SG, Rocha-Rodríguez R, Ornelas-Ocampo K, Vázquez-Alvarado JMP, Hernández-Guzmán FJ and Garduño-Audelo M. 2023. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* against *Rhizoctonia solani*. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 514-523.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2304-2>

First DOI publication: August 28, 2023.

Primera publicación DOI: 28 de Agosto, 2023.

Abstract. *Trichoderma* spp., is a highly efficient antagonist of root pathogens, such as *Rhizoctonia solani*, which causes loss in many crops. The aim of this research was to evaluate *in vitro* the antagonistic capacity of *T. viride*, *T. koningii*, *T. harzianum* and *Trichoderma* spp. isolates against *R. solani* from a potato crop. In confrontation tests, all *Trichoderma* isolates were classified as antagonists

Resumen. *Trichoderma* spp., es un antagonista muy eficiente de patógenos de las raíces de papa. *Rhizoctonia solani*, causa pérdidas en varios cultivos agrícolas. El objetivo de este trabajo, fue evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de *T. viridie*; *T. koningii*; *T. harzianum* y *Trichoderma* spp. frente a *R. solani* proveniente de un cultivo de papa. En las pruebas de confrontación, todos los aislamientos de *Trichoderma* se ubicaron en la clase 2 de antagonismo de la escala de Bell, donde *T. harzianum* y *T. koningii* mostraron más de 60% de inhibición del crecimiento radial de *R. solani* a las 120 h. En la interacción de *T. harzianum* y *Trichoderma* spp. con *R. solani*, como estrategia de micoparasitismo, se observó vacuolización, lisis, enrollamiento y penetración; las dos últimas presentes en todos los aislados evaluados de *Trichoderma*.

Palabras clave: Confrontación, micoparasitismo, biocontrol, biofungicida.

class 2 according to Bell scale, where *T. harzianum* and *T. koningii* showed more than 60% inhibition of the radial growth of *R. solani* at 120 h. In the interaction between *T. harzianum* and *Trichoderma* spp. with *R. solani*, as mycoparasitism strategy, vacuolization, lysis, coiling, and penetration were demonstrated, the last two were present in all *Trichoderma* isolates evaluated.

Key words: Confrontation, mycoparasitism, biocontrol, biofungicide.

Potato (*Solanum tuberosum*) is one of the main global crops, after sugarcane (*Saccharum officinarum*), corn (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum* spp.) (FAO, 2016). Diseases affecting roots, tubers and leaves of the potato plant can prevent proper tuber formation. One of such disease is black scab, caused by the pathogen *Rhizoctonia solani* (Betancourth *et al.*, 2021). This pathogen infects many wild and cultivated plants in Mexico (DGSV-CNRF, 2020).

To control *R. solani*, growers often apply synthetic fungicides such as Carbendazim, Copper phosphite and Thiabendazole (Alburqueque and Gusqui, 2018). Chemicals like Azoxystrobin and propiconazole also provide effective disease control (Khan and Bolton, 2010). However, chemical control is not recommended due to the high residue levels (Leadbeater and Gisi, 2010). Therefore, alternative methods to control *R. solani* have been explored, including biological control.

The antagonistic effect of some *Trichoderma* species on *R. solani* was first described in 1932 (Weindling, 1932). Today, *Trichoderma* is used to protect plants from root pathogens like *R. solani*, and to stimulate plant defense mechanisms (Korolev *et al.*, 2008). *Trichoderma* can parasitize and eliminate a wide range of fungal plant pathogens

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los principales cultivos a nivel mundial, después de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum* spp.) (FAO, 2016). Las enfermedades que afectan a la papa, lo hacen en las raíces, tubérculos y hojas, lo que impide la formación adecuada del tubérculo; dentro de estas, se encuentra la costra negra causada por *Rhizoctonia solani* (Betancourth *et al.*, 2021). Este patógeno infecta un gran número de plantas silvestres y cultivadas en México (DGSV-CNRF, 2020).

Para el control de *R. solani*, los productores aplican fungicidas sintéticos como Carbendazim, Fosfito de cobre y Tiabendazol (Alburqueque y Gusqui, 2018). El azoxistrobin y el propiconazol proporcionan un control eficaz de la enfermedad (Khan y Bolton, 2010). El control químico es inconveniente por su alta residualidad (Leadbeater y Gisi, 2010); por lo cual, se han investigado alternativas para el control de *R. solani*, entre las que se cuenta el control biológico.

El efecto antagónico de algunas especies de *Trichoderma* sobre *R. solani* fue descrito en 1932 (Weindling, 1932). Actualmente se utiliza para proteger a la planta de patógenos de la raíz y para estimular sus mecanismos de defensa (Korolev *et al.*, 2008). *Trichoderma* parasita y elimina un amplio número de hongos que afectan a las plantas de interés agrícola (Romero-Arenas *et al.*, 2017). El éxito y su empleo en la agricultura se debe a sus mecanismos de acción (Infante y Martínez, 2019).

El uso agrícola de especies de *Trichoderma*, es una alternativa tecnológica para la obtención de biofungicidas de alta calidad (Hernández-Mendoza *et al.*, 2012; Companioni *et al.*, 2019), que, a pesar de su potencial, su aplicación en México para el manejo de enfermedades en papa, ha sido escaso y los problemas con *R. solani* siguen vigentes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in*

(Romero-Arenas *et al.*, 2017). Its agricultural success and use stems from its diverse mechanisms of action (Infante and Martínez, 2019).

The agricultural utilization of *Trichoderma* species represents a promising technological approach for producing high-quality biofungicides (Hernández-Mendoza *et al.*, 2012; Companioni *et al.*, 2019). Despite its considerable potential, the application of *Trichoderma* based solutions for disease management in potatoes remains limited in Mexico, and challenges associated with addressing *Rhizoctonia solani* infections persist. Thus, the primary aim of this study was to conduct an *in vitro* assessment of the efficacy of four distinct *Trichoderma* species as potential biofungicides targeting *Rhizoctonia solani*.

In this research, isolates of *T. viride* (*Tv*), *T. koningii* (*Tk*), *T. harzianum* (*Th*), and *Trichoderma* spp. (*Tspp.*) employed, isolates were obtained from the collection maintained by the Universidad Tecnológica del Sur in Morelos. Concurrently, the *R. solani* strain was procured from the Zacatepec Experimental Station of the National Institute of Forestry, Agriculture, and Livestock Research (INIFAP). The isolation of *R. solani* involved obtaining samples from infected potato plants of Fiana variety from Toluca, Mexico state. Subsequent to carefully rinsing the plants to eliminate soil residues through flowing water, symptomatic one squared centimeter sections from various plant segments were disinfected utilizing 3% sodium hypochlorite for 5 min., followed by rinsing with sterile distilled water. These sections were plated on Petri dishes with Sabouraud dextrose agar culture medium (MCD LAB) and subjected to an incubation period of 25 ± 2 °C for 48 hrs. Establishment of pure cultures were achieved by inoculating Petri dishes with hyphal tips possessing characteristics and morphology indicative of *R. solani*. Both *Trichoderma* species

in vitro la efectividad biológica de cuatro especies de *Trichoderma* como potenciales biofungicidas contra *Rhizoctonia solani*.

Se utilizaron aislamientos de *T. viridie* (*Tv*), *T. koniingii* (*Tk*), *T. harzanium* (*Th*) y *Trichoderma* spp. (*Tspp.*), procedentes del cepario de la Universidad Tecnológica del Sur del estado de Morelos. El aislamiento de *R. solani*, lo aportó el Campo Experimental Zacatepec, del INIFAP. Para el aislado de *R. solani*, se tomaron muestras infectadas por el hongo en el cultivo de la papa variedad Fiana proveniente de Toluca, Estado de México. Las plantas fueron lavadas con agua corriente para retirar el exceso de tierra; posteriormente, secciones con síntomas de un centimetro de diferentes partes de la planta fueron desinfestadas con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min y después enjuagadas con agua destilada estéril. Después se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (MCD LAB) y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 48 h. Se obtuvieron cultivos puros mediante la siembra de puntas de hifa con características y morfología de *R. solani*. Los aislamientos de *Trichoderma* y *R. solani* aquí descritos se encuentran acualmente en proceso de identificación molecular.

Para las evaluaciones, los hongos se mantuvieron en medio agar dextrosa Sabouraud a una temperatura de 25 ± 2 °C por 96 h (*Trichoderma*) y por 10 días (*R. solani*).

La competencia por espacio entre las especies de *Trichoderma* y *R. solani*, se evaluó utilizando el método de confrontación dual Bell *et al.* (1982), descrito por Martínez y Solano (1994). La evaluación se realizó en cajas Petri de 90 mm de diámetro, con medio agar dextrosa Sabouraud. Se sembraron individualmente discos de 5 mm de agar con micelio de *Tv*, *Tk*, *Th* y *Tspp.* a un centímetro del borde de cada caja Petri (réplica) y en el otro extremo un disco de 5 mm con crecimiento de *R. solani*. Como control se sembró *R. solani* sin presencia de

and *R. solani* isolates described in this study are currently undergoing molecular identification procedures.

For evaluations, fungi were cultivated on Sabouraud dextrose agar medium at controlled temperature of 25 ± 2 °C for 96 hrs (*Trichoderma* species) and for 10 days (*R. solani*).

Competition for resources between *Trichoderma* species and *R. solani* were evaluated using the dual confrontation method as outlined by Bell *et al.* (1982) and detailed by Martínez and Solano (1994). Evaluation were conducted in 90 mm diameter Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar medium. Individual 5 mm agar disks harboring mycelium of *Tv*, *Tk*, *Th*, and *Tspp.* were positioned one centimeter from the edge of each Petri dish (replicate), with a 5 mm disk of *R. solani* growth positioned at the opposing end. In parallel, a control experiment featuring *R. solani* growth without of *Trichoderma* species were conducted employing a completely randomized design, five treatments, with five replicates (Petri dishes), were evaluated. Radial growth measurements during confrontations were taken at 24-hr intervals, up to 120 hrs, within a controlled environment of 25 ± 2 °C.

Classification of *Tv*, *Tk*, *Th*, and *Tspp.* isolates as antagonists against *R. solani* was executed using the five class scale introduced by Bell *et al.* (1982). Percentage Inhibition of Radial Growth Rate (PIRGR) was calculated using the formula $PIRGR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, where R1 represents the radial growth of the phytopathogen colony within the control treatment, and R2 signifies the radial growth of the pathogenic isolate when confronted by the antagonist (Rahman *et al.*, 2009). Statistical analysis of PIRGR data were performed employing IBM SPSS® Statistics for Windows version 25 (IBM Corp, Armonk, New York, USA). Prior to analysis, normality and homogeneity of variance were assessed using the Levene and Kolmogorov-

Trichoderma. Se evaluaron cinco tratamientos con cinco repeticiones (cajas Petri) en un diseño completamente al azar. Las mediciones de crecimiento radial en confrontación se realizaron cada 24 h, hasta las 120 h a una temperatura de 25 ± 2 °C.

La clasificación como antagonistas de los aislamientos *Tv*, *Tk*, *Th* y *Tspp.* frente a *R. solani* se realizó según la escala de cinco clases propuesta por Bell *et al.* (1982). El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) se determinó con la fórmula $PCIR = (R1 - R2) / R1 \times 100$; donde R1 es el crecimiento radial de la colonia del fitopatógeno en el tratamiento control y R2 el crecimiento radial del aislamiento patógeno enfrentado al antagonista (Rahman *et al.*, 2009). Los análisis estadísticos del PICR se realizaron con el software estadístico IBM SPSS® Statistics para Windows vs 25 (IBM Corp, Armonk, Nueva York, USA). Se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza mediante el test de Levene y Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, se procedió al análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0,01$).

El micoparasitismo se observó en la zona de contacto entre ambos hongos (antagonista-patógeno) y se evaluó el tipo de interacción hifal (enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis) (Chet *et al.*, 1981). Para ello, se tomaron muestras con cinta adhesiva de la zona de interacción y después se colocaron en un portaobjeto con una gota de azul de lactofenol. Las muestras se observaron a 40X en un microscopio óptico (LABOMED, modelo CXL TRINOCULAR 9135007). Se realizaron tres preparaciones por réplica (caja Petri).

Los cuatro aislamientos de *Trichoderma* evaluados se ubicaron en la clase 2 de antagonismo de la escala de Bell *et al.* (1982) (Figura 1), con un crecimiento de más del 60% de la superficie sobre *R. solani*. Utilizando la misma escala, las evaluaciones *in vitro* de Pérez *et al.* (2020) mostraron que

Smirnov tests. Subsequently, an analysis of variance and Tukey's mean comparison test ($p \leq 0.01$) was executed.

Mycoparasitism was observed in the contact zone between the two fungi (antagonist pathogen), and the array of hyphal interactions; rolling, penetration, vacuolization, and lysis were assessed in accordance with the methodology outlined by Chet *et al.* (1981). To conduct this analysis, adhesive tape was utilized to obtain samples from the interaction zone, which were subsequently mounted on slides with a drop of lactophenol blue. Examination of samples were carried out under an optical microscope (LABOMED, model CXL TRINOCULAR 9135007) at 40X magnification. Each replicate (Petri dish) encompassed three distinct preparations.

The four *Trichoderma* isolates subjected to evaluation were classified within antagonism class 2 of the scale established by Bell *et al.* (1982) (Figure 1). Their growth encompassed more than 60% of the surface area occupied by *R. solani*. By applying the same scale, *in vitro* assessments conducted by Pérez *et al.* (2020) demonstrated that *T. atroviride*, *T. konigiopsis*, and *T. harzianum* exhibited an overgrowth exceeding 85% over *R. solani*, warranting their classification within antagonism class 1. Likewise, when assayed against *Botrytis* sp., strains of *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. inhamatum*, and *T. harzianum* were classified as belonging to class 1 (Acosta *et al.*, 2021), a classification shared by *T. asperellum* and *Trichoderma* spp. in relation to *B. cinerea* (Pincay *et al.*, 2021).

The antagonistic interaction between fungi is mediated through an intricate network of attack and counter-response mechanisms. Within the arsenal of attack strategies employed by *Trichoderma* species, a diverse array is noteworthy, including parasitism, antibiosis, competition for resources and space,

T. atroviride, *T. konigiopsis* y *T. harzianum* presentaron un sobre crecimiento mayor a 85% por encima de *R. solani*, clasificándolas en la clase 1 de antagonismo. Asimismo, frente a *Botrytis* sp. las cepas de *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. inhamatum* y *T. harzianum* se clasificaron en la clase 1 (Acosta *et al.*, 2021), al igual que *T. asperellum* y *Trichoderma* spp. contra *B. cinerea* (Pincay *et al.*, 2021). El antagonismo entre hongos esta mediado por una serie de mecanismos de ataque y respuesta entre el biocontrolador y el patógeno. *Trichoderma*, posee una gran variedad de mecanismos de ataque; entre los más conocidos se encuentran el parasitismo, la antibiosis, la competencia por nutrientes y espacio, la liberación de enzimas que afectan el metabolismo de otros microorganismos, la activación de repuesta de defensa, la estimulación de la germinación y crecimiento (Morales-Mora *et al.*, 2020).

Todos los tratamientos mostraron un efecto antagónico superior al 50% a partir de las 96 h (Cuadro 1), observándose crecimiento sobre la colonia de *R. solani* (Figura 1). A las 120 h *Tk*, *Th* y *Tspp.* mostraron los mayores porcentajes de inhibición, todos con diferencias significativas en sus valores promedio ($p \leq 0,01$). Los resultados muestran que estos presentan mayor velocidad de crecimiento a partir de las 72 h, por posibles metabolitos desprendidos por *R. solani* (Cuadro 1).

En otros ensayos *in vitro*, especies de *Trichoderma* mostraron una inhibición con *Trichothecium* sp., *Cladosporium* sp. y *Fusarium* sp. mayor al 50%; frente a *Didymella bryoniae* del 75% (Martínez *et al.*, 2013). El uso de *Trichoderma* spp. cepa nativa TC05, en condiciones *in vitro* y en casa de malla demostró un alto potencial antagónico frente a *Fusarium* spp. (Rodríguez-Pinto *et al.*, 2021). Establecer *in vitro* los mecanismos de acción presentes en los aislamientos de antagonistas, constituye la base de la selección de estos, no solo para las pruebas siguientes en condiciones semicontroladas

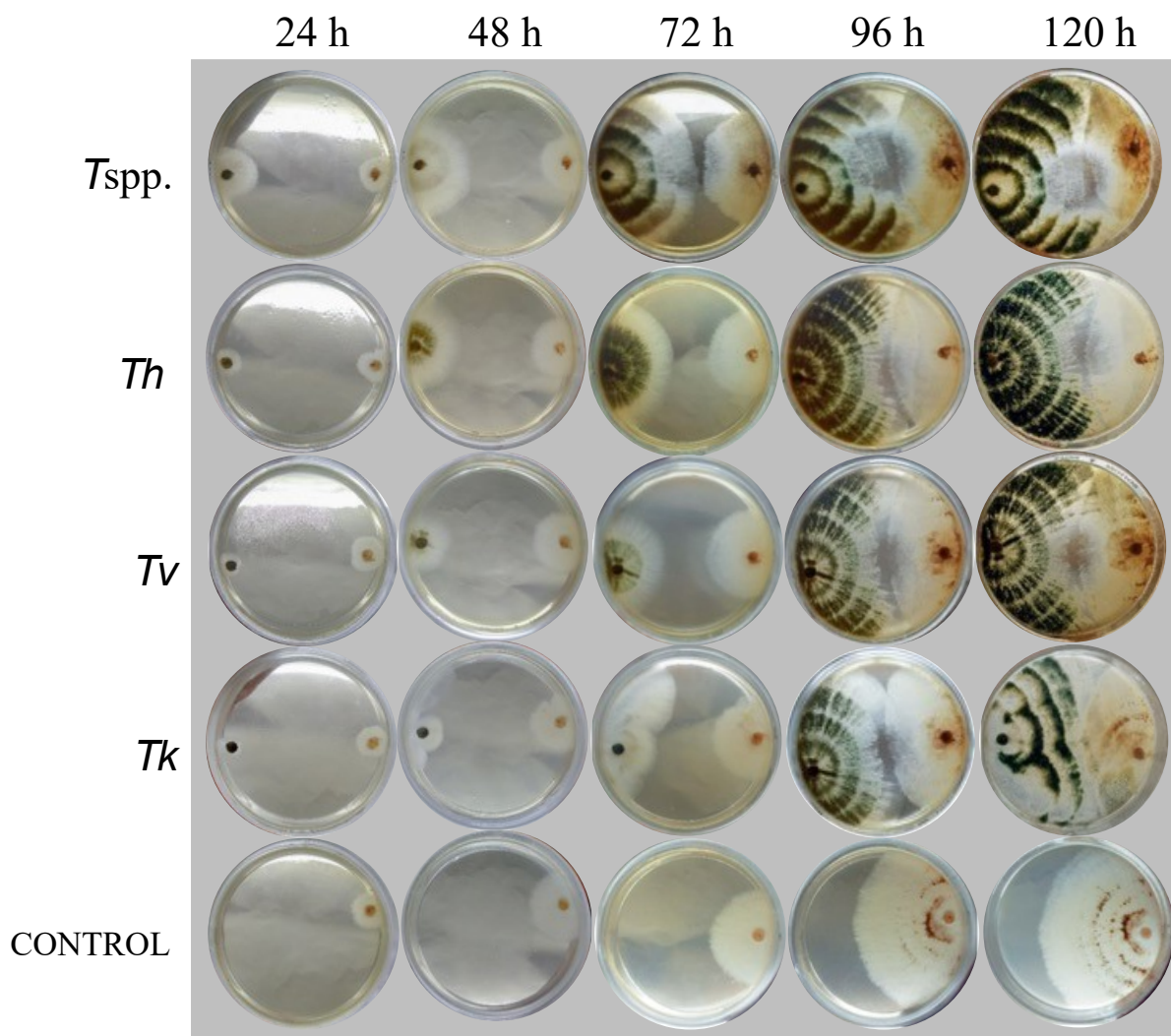


Figure 1. Confrontation of *Trichoderma* isolates with *R. solani* were carried out on Sabouraud agar, followed by the assessment of *R. solani*'s radial growth inhibition at 24 hr intervals. The used abbreviations were as follows: *Tspp.* (*Trichoderma* spp.), *Th* (*T. harzianum*), *Tv* (*T. viride*), *Tk* (*T. koningii*), with the control group represented by *R. solani*.

Figura 1. Confrontación de aislamientos de *Trichoderma* frente a *R. solani* en agar Sabouraud y evaluación de la inhibición del crecimiento radial de *R. solani* cada 24 h. *Tspp.*: *Trichoderma* spp., *Th*: *T. harzianum*, *Tv*: *T. viridie*, *Tk*: *T. koningii*, control: *R. solani*.

enzymatic disruption of other microorganisms metabolisms, elicitation of defense responses, and facilitation of germination and growth (Morales-Mora *et al.*, 2020).

All treatments exhibited an antagonistic effect exceeding 50% after 96 hrs, as indicated in Table 1. Growth of *R. solani* colony displayed noticeable changes, as illustrated in Figure 1. At 120 hrs, *Tk*, *Th*,

y campo, sino que orientan la forma de producción que debe establecerse para lograr mayor estabilidad y eficacia en los resultados en campo.

En la Figura 2 se muestra la zona de confrontación entre *Th* y *R. solani* donde al igual que *Tspp.* se observaron cuatro tipos de interacción hifal con enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis de hifas; mientras que *Tv* y *Tk* presentaron dos y

**Table 1. Radial Growth Inhibition (RIGI) of *Trichoderma* on *R. solani*.
 Cuadro 1. Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de *Trichoderma* sobre *R. solani*.**

| Treatments | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Tspp.</i> | 17.8 c | 26.2 c | 32.7 c | 55.1 c | 65.5 c |
| <i>Th</i> | 22.2 b | 27.9 b | 36.3 b | 57.3 b | 66.7 b |
| <i>Tv</i> | 11.1 d | 20.5 d | 29.8 d | 50.4 d | 57.0 d |
| <i>Tk</i> | 24.4 a | 31.2 a | 43.3 a | 61.2 a | 67.5 a |
| Es χ | 1.31* | 1.0* | 1.3* | 1.0* | 1.08* |
| CV (%) | 27.76 | 15.12 | 14.66 | 7.17 | 6.74 |

Tspp. = *Trichoderma* spp.; *Th* = *T. harzianum*; *Tv* = *T. viride*; *Tk* = *T. koningii*; Es χ = standard error of the mean; CV = coefficient of variation. Different letters in the same column indicate significant differences according to Tukey's multiple range test ($p \leq 0.01$). / *Tspp.* = *Trichoderma* spp.; *Th* = *T. harzianum*; *Tv* = *T. viridie*; *Tk* = *T. koningii*; Es χ = error estándar de la media; CV = Coeficiente de variación. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según prueba de rangos múltiples de Tukey ($p \leq 0,01$).

and *Tspp.*, treatments showed the most substantial inhibition percentages. Notably, all three treatments exhibited statistically significant differences in their mean values ($p \leq 0.01$). Furthermore, data revealed that after 72 hrs, treatments demonstrated an increased growth rate. This phenomenon could be attributed to potential metabolites released by *R. solani*, as detailed in Table 1.

Other *in vitro* assessments, *Trichoderma* spp. exhibited inhibition rates exceeding 50% against *Trichothecium* sp., *Cladosporium* sp., and *Fusarium* sp.; meanwhile, it demonstrated a remarkable 75% inhibition against *Didymella bryoniae* (Martínez *et al.*, 2013). Using the native strain TC05 of *Trichoderma* spp., both under *in vitro* conditions and within a mesh house, revealed a substantial antagonistic potential against *Fusarium* spp. (Rodríguez-Pinto *et al.*, 2021). Elucidation of underlying mechanisms of action exhibited by these antagonist isolates *in vitro* forms the foundation for their selection. This selection process pertains not only to subsequent assessments under semi-controlled and field conditions but also guides the formulation of production strategies aimed at achieving enhanced stability and efficacy in field results.

tres tipos de interacción; respectivamente, siendo el enrollamiento y la penetración de hifas las estrategias de micoparasitismo utilizadas por todos los aislamientos de *Trichoderma* evaluados (Cuadro 2). Se ha descrito que la combinación de diferentes formas de micoparasitismo, favorece la acción de biocontrol sobre el fitopatógeno (Companioni *et al.*, 2019).

Las especies de *Trichoderma* producen enzimas tales como β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, quitinasas y proteasas, capaces de hidrolizar la pared celular de numerosos hongos (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Durante este proceso, las hifas de *Trichoderma* crecen quimiotrópicamente hacia el huésped, una vez cerca del patógeno, comienza su adhesión y enrollamiento para finalizar con la actividad lítica.

Los resultados obtenidos en la confrontación dual de *T. harzianum* y *T. koningii* contra *R. solani*, mostraron altos porcentajes de inhibición del crecimiento radial. Así como, *T. harzianum* y *Trichoderma* spp. presentaron cuatro tipos de interacción hifal con el patógeno y todas las especies evaluadas se ubicaron en la clase 2 de la escala de Bell *et al.* (1982).

Figure 2, shows the confrontation zone between *Th* and *R. solani*, where similar to *Tspp.*, four distinct types of hyphal interactions were observed, encompassing coiling, penetration, vacuolization, and lysis of hyphae. Meanwhile, *Tv* and *Tk* exhibited two and three types of interactions, respectively. On the other hand, coiling and hyphal penetration emerged as the predominant mycoparasitic

Todos aislados de *Trichoderma* mostraron niveles similares de antagonismo frente a *R. solani*; sin embargo, establecer *in vitro* la interacción con otras cepas de *R. solani*, diferentes hongos fitopatógenos y en los cultivos de origen ayudaría a la selección de especies de *Trichoderma* con las mejores características de parasitismo y control.

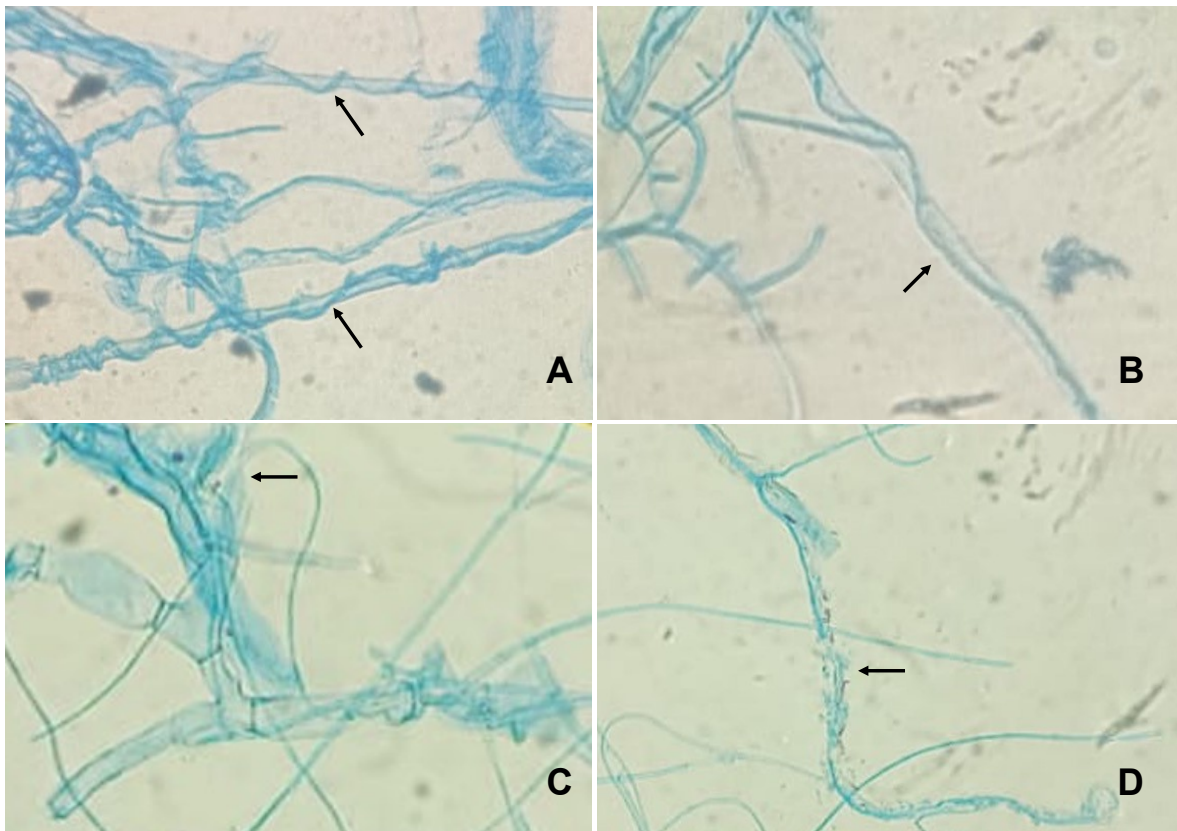


Figure 2. Mechanisms of antagonistic action of *T. harzianum* on *R. solani*: coiling (A), penetration (B), vacuolization (C) and lysis (D).

Figura 2. Mecanismos de acción antagonica de *T. harzianum* sobre *R. solani*: enrollamiento (A), penetración (B), vacuolización (C) y lisis (D).

strategies employed by all evaluated *Trichoderma* isolates (Table 2). Literature has documented that the amalgamation of diverse mycoparasitic tactics

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

**Table 2. Types of hyphal interaction between *Trichoderma* isolates and *R. solani*.  
 Cuadro 2. Tipos de interacción hifal entre aislados de *Trichoderma* y *R. solani*.**

| Treatments                               | Hyphal interaction type |
|------------------------------------------|-------------------------|
| <i>Trichoderma</i> spp. ( <i>T</i> spp.) | E-P-L-V                 |
| <i>T. harzianum</i> ( <i>Th</i> )        | E-P-L-V                 |
| <i>T. viridie</i> ( <i>Tv</i> )          | E-P                     |
| <i>T. koningii</i> ( <i>Tk</i> )         | E-P-L                   |

Coiling (E), Penetration (P), vacuolization (V) and Lysis (L). / Leyenda: Enrollamiento (E), Penetración (P), Vacuolización (V) y Lisis (L).

contributes to a more effective biocontrol action against phytopathogens (Companiononi *et al.*, 2019).

*Trichoderma* species produce enzymes, including  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,6-glucanases, chitinases, and proteases, capable of breaking down cell walls of various fungi (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). In this process, *Trichoderma* species hyphae exhibit chemotropic growth towards the host. When in close proximity to the pathogen, their attachment and coiling initiate, ultimately leading to lytic activity.

Results from dual confrontation of *T. harzianum* and *T. koningii* with *R. solani* revealed significant radial growth inhibition rates. Correspondingly, both *T. harzianum* and *Trichoderma* spp. displayed four distinct types of hyphal interactions with the pathogen. Furthermore, all assessed species were categorized under class 2 on the Bell *et al.* scale (1982).

While all *Trichoderma* isolates exhibited comparable levels of antagonism against *R. solani*, exploring *in vitro* interactions with diverse *R. solani* strains, varying phytopathogenic fungi, and the original crop environments could aid in selecting *Trichoderma* species showcasing optimal parasitic and control characteristics.

## CITED LITERATURE

- Acosta LT, Azania KD and Azania R. 2021. Cultivo dual *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* spp. patógeno de *Passiflora ligularis* Juss. Agropecuaria Science and Biotechnology 1: 43-55. <http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/RIAGROP/article/view/720/1022>.
- Ait-Lahsen H, Soler A, Rey M, De La Cruz J, Monte E and Llobell A. 2001. An antifungal exo-alpha-1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67: 5833–5839. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5833-5839.2001>.
- Alburqueque DA y Gusqui RM. 2018. Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. Arneloa 25: 489-498. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>.
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. Phytopathology 72: 379-382. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04\\_379](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379). PDF.
- Betancourth CA, Sañudo BA, Flórez CA y Salazar CE. 2021. Manejo de la costra negra de la papa (*Rhizoctonia solani*) con el establecimiento de abonos verdes. Información Tecnológica 32: 165-174. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642021000200165>.
- Chet I, Harman GE and Baker R. 1981. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbial Ecology 7: 29-38. <https://doi.org/10.1007/BF02010476>.
- Companiononi GB, Domínguez AG y García VR. 2019. *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. Biotecnología Vegetal 19: 237-248. <http://scielo.sld.cu/pdf/bvg/v19n4/2074-8647-bvg-19-04-237.pdf>.



- DGSV-CNRF. 2020. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Pudrición de la raíz, *Rhizoctonia solani*. Sader-Senasica. Ficha técnica. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/600968/Pudrición de la raíz.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/600968/Pudrición_de_la_raíz.pdf).
- FAO, Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2016. Producción agrícola, Hortalizas. <https://bit.ly/2LIKZxh> (consulta, octubre 2021).
- Hernández-Mendoza JL, Quiroz-Velázquez JD, Díaz-Franco A, García-Olivares JG, Bustamante-Dávila AJ and Gill-Langarica HR. 2012. Detection of metabolites in Flor de Mayo common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their response to inoculation with *Trichoderma harzianum*. African Journal of Biotechnology 11: 11767-11771. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/129007>.
- Infante MD y Martínez CB. 2019. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre aislados de diferentes grupos anastomóticos de *Rhizoctonia solani* Kühn. Revista de Protección Vegetal 34: 1-7. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522019000200008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522019000200008).
- Khan MFR and Bolton M. 2010. Management of *Rhizoctonia* root and crown rot of sugar beet. Plant Disease Management NDSU extension service. North Dakota State University. <https://www.ag.ndsu.edu/publications/crops/management-of-rhizoctonia-root-and-crown-rot-of-sugar-beets>.
- Korolev N, Rav DD and Elad Y. 2008. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. BioControl 53: 667-683. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9103-3>.
- Leadbeater A and Gisi U. 2010. The challenges of chemical control of plant diseases. In: Gisi U, Chet I, Gullino ML (eds.) Recent developments in management of plant diseases. Dordrecht: Springer. 3-17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9_1).
- Martínez B, Pérez J, Infante D, Duarte Y y Moreno M. 2013. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. Protección Vegetal 28: 192-198. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n3/rpv05313.pdf>.
- Martínez B. y Solano T. 1994. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. Protección Vegetal.10:221-225.
- Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV y 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: 434-449. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>.
- Pérez AA, Pérez MA, Martínez CB, Rollhaiser IN y Blengini MC. 2020. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. *in vitro* como potenciales biofungicidas para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn en la papa. Agriscientia 37: 21-33. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v37.n2.29419>.
- Pincay A, Noboa M, Viera W, Herrera K, León A y Jackson T. 2021. Evaluación *in vitro* del potencial antagonista de *Trichoderma* spp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para el control de *Botrytis cinerea*. Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación 6: 109-124. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8023668>.
- Rahman MA, Begum MF and Alam MF. (2009). Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against *Ceratocystis paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. Mycobiology 37(4): 277-285. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.4.277>.
- Rodríguez-Pinto ML, Campo-Arana RO, Cardona-Ayala CE, Manjarres-Cogollo EE y Rossi-Tordecilla BJ. 2021. *Trichoderma* spp. biocontrolador de marchitez vascular (*Fusarium* spp.) de la berenjena en el Caribe colombiano. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 19:158-169. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1847>.
- Romero-Arenas O, Amaro JL, Damián MA, Valencia de Ita MA, Rivera A y Huerta M. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. ITEA 113: 313-324. <http://doi.org/10.12706/itea.2017.019>.
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22: 837-845. <https://eurekamag.com/research/013/594/013594922.php>.

# Diagrammatic scale to evaluate the severity of gray mold (*Botrytis cinerea*) in pomegranate

## Escala diagramática para evaluar la severidad del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de granada

Alberto Patricio-Hernández, Yuridia Mercado-Flores\*, Alejandro Téllez-Jurado, María del Rocío Ramírez-Vargas, Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca-Cd. Sahagún, Km 20, Rancho Luna, Ex Hacienda de Santa Bárbara, C.P. 43830. Zempoala, Hidalgo, México; Andrés Quezada-Salinas, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Carretera Federal México-Pachuca, Km 37.5, Avenida Centenario de la Educación, Colonia Santa Ana, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México, México.

\*Corresponding author: yuridiamercado@upp.edu.mx

Received: February 26, 2023.

Accepted: August 25, 2023.

Patricio-Hernández A, Mercado-Flores Y, Téllez-Jurado A, Ramírez-Vargas MdelR and Quezada-Salinas A. 2023. Diagrammatic scale to evaluate the severity of gray mold (*Botrytis cinerea*) in pomegranate. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 524-536.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-9>

First DOI publication: August 31, 2023.

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2023.

**Abstract.** The aim of this study was to design and validate a diagrammatic scale to estimate the severity of gray mold induced by *Botrytis cinerea* in pomegranate cultivation. A total of 120 healthy and diseased fruits with varying degrees of affliction were collected from orchards with active production located in the municipalities of Chilcuahutla and Taxquillo in the state of Hidalgo, Mexico (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" W, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" W, respectively). From these, 60 were selected to

**Resumen.** El objetivo del presente trabajo fue diseñar y validar una escala diagramática para estimar la severidad del moho gris inducida por *Botrytis cinerea* en el cultivo de granada. Se colectaron 120 frutos sanos y enfermos con diferentes grados de afectación de huertos con producción activa localizados en los municipios de Chilcuahutla y Taxquillo en el estado de Hidalgo, México (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" O, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" O, respectivamente), de los cuales, se seleccionaron 60 para determinar el porcentaje de severidad, de acuerdo a una escala de 6 clases (Clase 0 = 0%, Clase 1 = >0% - 5% - 10%, Clase 2 = >10% - 25% - 50%, Clase 3 = >50% - 75% - 85%, Clase 4 = >85% - 90% - 95% y Clase 5 = >95% - 100%) mediante el software 2LOG. Con los datos obtenidos se seleccionaron imágenes representativas para construir la escala diagramática mediante Adobe Photoshop. Se verificó la exactitud ( $r^2$ ), la precisión ( $\beta_0$ ) y la reproducibilidad ( $\beta_1$ ) mediante regresión lineal simple aplicada a los datos obtenidos por 12

determine the severity percentage, according to a 6-class scale (Class 0 = 0%, Class 1 = >0% - 5% - 10%, Class 2 = >10% - 25% - 50%, Class 3 = >50% - 75% - 85%, Class 4 = >85% - 90% - 95%, and Class 5 = >95% - 100%), using the 2LOG software. With the obtained data, representative images were selected to build the diagrammatic scale using Adobe Photoshop. The accuracy ( $r^2$ ), precision ( $\beta_0$ ), and reproducibility ( $\beta_1$ ) were verified by simple linear regression applied to the data obtained by 12 evaluators with and without experience in the observation of plant diseases. As a result, values of  $r^2$  of 0.42 and 0.85 were obtained, without and with the use of the scale, respectively, which confirmed that this tool is suitable to evaluate the severity of the disease accurately and reproducibly.

**Keywords:** Phytosanitary, *Punica granatum*, *Botrytis cinerea*, disease measurement.

Pomegranate is the fruit of the pomegranate tree (*Punica granatum*), which is consumed worldwide and is currently cultivated in Iran, Spain, Italy, Afghanistan, the United States, India, China, Russia, Uzbekistan, Morocco, Greece and Mexico (Koba and Yanagita, 2011). Its production has gained importance due to the functional properties it possesses, which is why various food products such as juices and liquors are produced, in addition to its importance in the cosmetic industry (Ge *et al.*, 2021). In Mexico in 2021, 1,251 ha were cultivated and 8,636 t were produced. The states with the highest harvest volumes were Morelos, Hidalgo and Oaxaca with 1,622, 1,467 and 1,327 t, respectively (SIAP, 2021), destined for both domestic consumption and export. Pomegranate orchards are affected by diseases induced by various microorganisms such as *Alternaria* spp. and *Aspergillus* spp., with the greatest impact

evaluadores con y sin experiencia en la observación de enfermedades en plantas. Como resultado se obtuvieron valores de  $r^2$  de 0.44 sin el uso de la escala, y con el uso de esta herramienta de 0.81 y 0.90 para la primera y segunda evaluación respectivamente, lo cual confirmó que esta herramienta es adecuada para evaluar la severidad de la enfermedad de manera precisa y reproducible.

**Palabras clave:** Fitosanidad, *Punica granatum*, *Botrytis cinerea*, medición de enfermedad.

La granada es el fruto del árbol de granado (*Punica granatum*), la cual es consumida en todo el mundo y actualmente se cultiva en Irán, España, Italia, Afganistán, Estados Unidos, India, China, Rusia, Uzbekistán, Marruecos, Grecia y México (Koba y Yanagita, 2011). Su producción ha cobrado importancia por las propiedades funcionales que posee, por lo que se elaboran diversos productos alimenticios como jugos, zumos y licores, además de que posee importancia en la industria cosmética (Ge *et al.*, 2021). En México, en el año 2021, se cultivaron 1,251 ha en donde se produjeron 8,636 t. Los estados con mayor volumen de cosecha fueron Morelos, Hidalgo y Oaxaca con 1,622, 1,467 y 1,327 t, respectivamente (SIAP, 2021), destinadas tanto para consumo nacional como para la exportación. Por otro lado, los huertos de granado son afectados por enfermedades inducidas por diversos microorganismos tales como *Alternaria* spp y *Aspergillus* spp, siendo las de mayor impacto las que afectan directamente al fruto desde precosecha (Behzad *et al.*, 2020), tal es el caso del moho gris inducido por *Botrytis cinerea*, enfermedad que ha sido reportada principalmente en huertos de granado en Grecia y Pakistán (Bardas *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2018), la cual se presenta posterior a la floración en los comienzos de la formación del fruto, y

being those that directly affect the fruit pre-harvest (Behzad *et al.*, 2020). One such disease is gray mold induced by *Botrytis cinerea*, which has been reported mainly in pomegranate orchards in Greece and Pakistan (Bardas *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2018). It occurs after flowering at the beginning of fruit formation and is characterized by the presence of spots that increase in size, with light to dark brown expanded lesions of soft consistency, followed by the appearance of gray mycelium on infected surfaces. Fruit may remain mummified on the tree. Recently, this phytosanitary problem has been reported in the State of Mexico, Mexico (Patricio-Hernández *et al.*, 2023). Diagrammatic scales could be a useful tool to estimate the severity of gray mold in pomegranate fruits pre- and post-harvest. These tools allow correct interpretation of disease advancement and progress in crops, defined as sets of illustrations of plants or plant organs, with signs and symptoms that show the percentages of area affected by the disease. This is based on the Weber-Fechner principle, which establishes classes in a logarithmic system that eliminates arbitrary designation of severity levels (French and Hebert, 1980). The scales should be quick and simple when used under field and post-harvest conditions, as well as accurate, precise and reproducible (Richard *et al.*, 2021; Vereschuk *et al.*, 2022). To date, no scales for assessing the severity of gray mold on pomegranate fruits have been reported. The objective of the present study was to develop and validate a diagrammatic scale to help growers and technicians assess disease severity.

During the months of July to September 2022, 120 pomegranate fruits with and without symptoms of gray mold (*Botrytis cinerea*) were collected in active production plots located in the municipalities of Chilcuahutla and Taxquillo, Hidalgo, Mexico (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" W, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" W, respectively). Subsequently, 60 fruits

que se caracteriza por la presencia de manchas que aumentan de tamaño, con lesiones expandidas de color marrón claro a oscuro de consistencia blanda, seguido de la aparición de micelio gris sobre las superficies infectadas. Los frutos pueden permanecer momificados en el árbol. Recientemente este problema fitosanitario ha sido reportado en el Estado de México, México (Patricio-Hernández *et al.*, 2023), por lo que se requiere de la utilización de escalas diagramáticas para estimar la severidad del moho gris en frutos de granada en pre y postcosecha, las cuales son herramientas que permiten una correcta interpretación del avance y progreso de enfermedades en los cultivos, definiéndose como conjuntos de ilustraciones de plantas u órganos vegetales, con signos y síntomas que muestran los porcentajes del área afectada por la enfermedad con base en el principio de Weber-Fechner, que permite establecer clases en un sistema logarítmico que elimina la designación arbitraria de los niveles de severidad (French y Hebert, 1980), las cuales, deben ser rápidas y simples al usarse bajo condiciones de campo y postcosecha, así como, exactas, precisas y reproducibles (Richard *et al.*, 2021; Vereschuk *et al.*, 2022). Hasta la fecha, no se han reportado escalas para evaluar la severidad del moho gris sobre frutos de granada. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar una escala diagramática, la cual servirá a los productores y técnicos para evaluar la severidad de la enfermedad.

Durante los meses de julio a septiembre del año 2022 se colectaron 120 frutos de granada con y sin síntomas de moho gris (*Botrytis cinerea*) en parcelas con producción activa ubicadas en los municipios de Chilcuahutla y Taxquillo, Hidalgo, México (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" O, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" O, respectivamente). Posteriormente se seleccionaron 60 frutos representativos de los diferentes grados de afectación. Para obtener la severidad real, cada fruto fue dividido a la mitad

representative of the different degrees of damage were selected. To obtain the actual severity, each fruit was divided in half in order to photograph the total surface of each one using a Canon T7 camera (Verechuk *et al.*, 2022).

To eliminate the background, the images were processed with GIMP® v.2.10.12 software. Quantification of the total and affected area was performed using Image Tool v1.8.0. With the obtained data, the actual severity percentage was calculated using the following formula:  $\text{severity} = (\text{diseased area} / \text{total image area}) * 100$  (Nutter Jr *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016). The data were used to define the minimum and maximum values of actual severity, which were then used to generate a logarithmic scale with six classes, using the 2LOG v.1 software (Mora-Aguilera and Acevedo-Sánchez, 2018). This follows the Weber-Fechner visual acuity law (Horsfall and Cowling, 1978). The obtained data were used to construct the diagrammatic scale with Adobe Photoshop software (Fantin *et al.*, 2018).

To validate the diagrammatic scale, 60 digital images representative of different degrees of severity were randomly inserted into individual slides to be visualized in Microsoft 365® PowerPoint and presented to 18 evaluators with and without experience in observing plant diseases. They carried out independent evaluations with approximately 20 s per image for visualization. Data from this first evaluation were expressed as percentage of severity (Fragoso-Benhumea *et al.*, 2022). For the first and second evaluations using the scale, 12 evaluators were selected based on the number of correct scores in the evaluation without the scale and their willingness for subsequent participation (Belan *et al.*, 2014). Each evaluation was carried out with an interval of 7 days between them.

To quantify the accuracy of the severity evaluations made by the evaluators, a simple

para poder tomar fotografías de la superficie total de cada uno con una cámara fotográfica profesional Canon T7 (Verechuk *et al.*, 2022).

Para eliminar el fondo, las imágenes fueron procesadas con el software GIMP® v.2.10.12. La cuantificación del área total y afectada se realizó con Image Tool v1.8.0. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de severidad real mediante la siguiente fórmula:  $\text{severidad} = (\text{área enferma} / \text{área total de la imagen}) * 100$  (Nutter Jr *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016). Los datos se utilizaron para definir los valores mínimos y máximos de severidad real, los cuales se utilizaron para generar una escala logarítmica con seis clases, con el software 2LOG v.1 (Mora-Aguilera y Acevedo-Sánchez, 2018), el cual sigue la ley de agudeza visual de Weber-Fechner (Horsfall y Cowling, 1978). Los datos obtenidos se utilizaron para construir la escala diagramática con el software Adobe Photoshop (Fantin *et al.*, 2018).

Para validar la escala diagramática, 60 imágenes digitales representativas de los diferentes grados de severidad se insertaron aleatoriamente en diapositivas individuales para ser visualizadas en Microsoft 365® Power Point y presentadas a 18 evaluadores con y sin experiencia en la observación de enfermedades en plantas, quienes realizaron evaluaciones en forma independiente en un tiempo aproximado de 20 s/imagen para su visualización. Los datos de esta primera evaluación se expresaron como porcentaje de severidad (Fragoso-Benhumea *et al.*, 2022). Para la primera y segunda evaluación con la escala se seleccionaron 12 evaluadores tomando como criterio la cantidad de aciertos en la evaluación sin la escala y su disposición para su participación subsecuente (Belan *et al.*, 2014). Cada evaluación se realizó con un intervalo de 7 días entre cada una.

Para cuantificar la exactitud de las evaluaciones de severidad que hicieron los evaluadores, se realizó una regresión lineal simple para verificar

linear regression was performed to verify the following hypotheses: for the intercept ( $\beta_0$ ) the null hypothesis  $H_0: \beta_0=0$  versus  $H_1: \beta_0 \neq 0$  and for the slope coefficient ( $\beta_1$ )  $H_0: \beta_1=1$  versus  $H_1: \beta_1 \neq 1$ , with a significance level of 5%, using a t-test. The actual values obtained were used as the independent variable and the estimated values per evaluator were used as the dependent variable (Da Silva *et al.*, 2019). This took into account that if the estimated values of the slope differ from 0, they indicate overestimation of the real severity when  $\beta_0 > 0$  and underestimation if  $\beta_0 < 0$ . Similarly, if the slope data differ from 1, they indicate overestimation of disease ( $>1$ ) or underestimation ( $<1$ ) at all disease severity levels (Nutter Jr. and Schultz, *et al.*, 1995; Nutter *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016).

Additionally, the precision of the estimation was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression and the absolute error was plotted. Furthermore, a paired data analysis per evaluator was performed. Statistical analyses were conducted using the Rstudio program (<http://www.rstudio.com/>).

From field collections in the municipalities of Chilcuautla and Taxquillo, Hidalgo, 120 fruits were obtained, of which 60 were selected based on their actual degree of severity. Those with 0% severity were considered healthy, while those showing signs and symptoms of gray mold were characterized by the presence of brown lesions originating at the base of the calyx and advancing towards the peduncle, causing rotting of the infected area with values ranging from 5 to 100%.

Based on the percentages of damaged area of the 60 selected fruits, the 2LOG program allowed the definition of six severity classes. The ranges and midpoints of each class (0, 1, 2, 3, 4 and 5) were expressed as percentage of affected area: Class 0= 0%, Class 1 = ( $>1 - 5 - 10$ )%, Class 2 = ( $>11 - 25 - 50$ )%, Class 3 = ( $>51 - 75 - 85$ )%, Class 4 = ( $>86 - 90 - 95$ )% and Class 5 = ( $>96 - 100$ )% (Figure 1).

las siguientes hipótesis: para el intercepto ( $\beta_0$ ) la hipótesis nula  $H_0: \beta_0=0$  versus  $H_1: \beta_0 \neq 0$  y para el coeficiente de la pendiente ( $\beta_1$ )  $H_0: \beta_1=1$  versus  $H_1: \beta_1 \neq 1$ , con un nivel de significancia del 5%, utilizando una prueba t, teniendo como variable independiente los valores reales obtenidos y como variable dependiente los valores estimados por evaluador (Da Silva *et al.*, 2019), tomando en cuenta que si los valores estimados de la pendiente son diferentes de 0, indican una sobreestimación de la severidad real cuando  $\beta_0 > 0$  y una subestimación si  $\beta_0 < 0$ . De igual manera si los datos de la pendiente son diferentes de 1, indican sobreestimación de la enfermedad ( $>1$ ) o una subestimación ( $<1$ ) en todos los niveles de severidad de la enfermedad (Nutter Jr. y Schultz, *et al.*, 1995; Nutter *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016).

También, la precisión de la estimación fue determinada por el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la regresión lineal y se graficó el error absoluto, además se realizó un análisis de datos pareados por evaluador. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Rstudio (<http://www.rstudio.com/>).

A partir de colectas en campo en los municipios de Chilcuautla y Taxquillo, Hgo., se obtuvieron 120 frutos de los cuales se seleccionaron 60 con base a su grado de severidad real. Aquellos con 0% de severidad fueron considerados sanos y los que presentaron signos y síntomas de moho gris, se caracterizaron por la presencia de lesiones marrones que se originaron en la base del cáliz y avanzaron hacia el pedúnculo lo que ocasiona pudrición del área infectada con valores desde 5 a 100% de afectación.

Con base en los porcentajes de área dañada de los 60 frutos seleccionados, el programa 2LOG permitió definir seis clases de severidad. Los rangos y los puntos medios de cada clase (0, 1, 2, 3, 4 y 5) se expresaron como porcentaje de la superficie afectada: Clase 0= 0, Clase 1 = ( $>1 - 5 - 10$ ), Clase

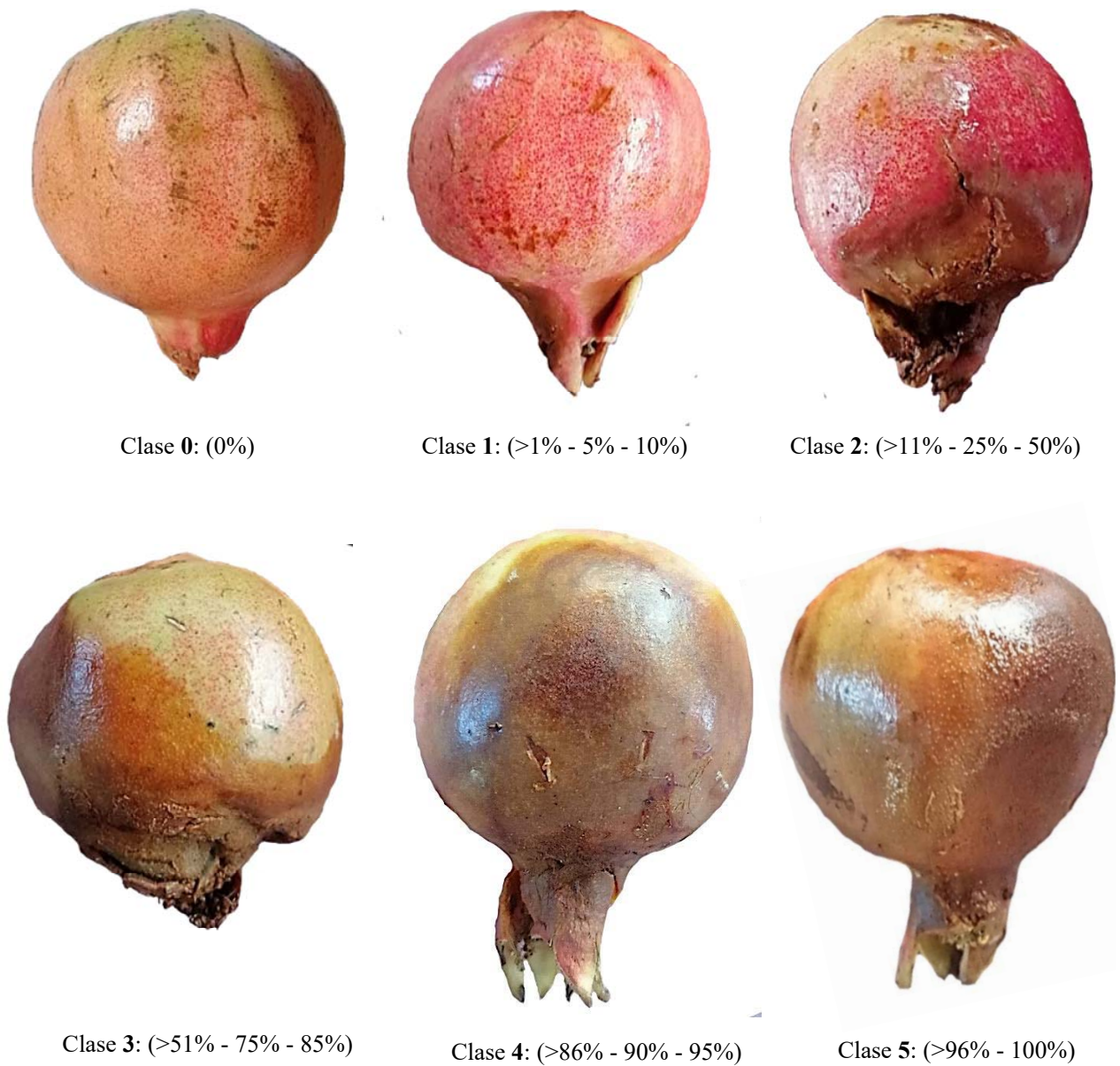


Figure 1. Diagrammatic scale for evaluation of gray mold (*Botrytis cinerea*) severity on pomegranate (*Punica granatum*) fruit. Severity intervals for each class are shown in parentheses.

Figura 1. Escala diagramática para evaluar severidad del moho gris (*Botrytis cinerea*) sobre frutos de granada (*Punica granatum*). Entre paréntesis se muestran los intervalos de severidad para cada clase.

The accuracy of the evaluations showed significant differences with and without the use of the designed scale. When the scale was not used, the  $r^2$  values ranged from 0.06 to 0.87 with a mean of 0.44. However, with the use of the scale, the results were from 0.71 to 0.93 for the first evaluation and from 0.70 to 0.97 for the second evaluation, with mean values of 0.81 and 0.90, respectively. Therefore, the estimations were accurate (Table 1).

2 = (>11 - 25 - 50), Clase 3 = (>51 - 75 - 85), Clase 4 = (>86 - 90 - 95) y Clase 5 = (>96 - 100) (Figura 1).

La exactitud de las evaluaciones mostró diferencias significativas con y sin el uso de la escala diseñada. Cuando ésta no fue utilizada, los valores de  $r^2$  variaron de 0.06 a 0.87 con una media de 0.44, sin embargo, con el uso de la escala los resultados fueron de 0.71 a 0.93, para la primera evaluación

**Table 1. Intercept ( $\beta_0$ ), slope ( $\beta_1$ ) and coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression equation of visual estimates of gray mold severity in *Punica granatum* fruits, performed with and without diagrammatic scaling.**

**Cuadro 1. Intercepto ( $\beta_0$ ), pendiente ( $\beta_1$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la ecuación de regresión lineal de las estimaciones visuales de la severidad del moho gris en frutos de *Punica granatum*, realizadas con y sin escala diagramáticas.**

|      | Coeficientes |    |           |    |       |                    |    |           |    |       |                    |    |           |    |       |
|------|--------------|----|-----------|----|-------|--------------------|----|-----------|----|-------|--------------------|----|-----------|----|-------|
|      | Sin Escala   |    |           |    |       | Con escala         |    |           |    |       |                    |    |           |    |       |
|      |              |    |           |    |       | Primera Evaluación |    |           |    |       | Segunda Evaluación |    |           |    |       |
|      | $\beta_0$    |    | $\beta_1$ |    | $r^2$ | $\beta_0$          |    | $\beta_1$ |    | $r^2$ | $\beta_0$          |    | $\beta_1$ |    | $r^2$ |
| EV1  | 11.96        | ns | 0.97      | ns | 0.68  | 0.05               | ns | 1.00      | ns | 0.93  | 0.25               | *  | 0.93      | ns | 0.82  |
| EV2  | 6.47         | *  | 0.43      | ns | 0.37  | 0.10               | ns | 0.82      | ns | 0.72  | 0.09               | ns | 0.99      | ns | 0.91  |
| EV3  | 20.85        | ns | 0.67      | ns | 0.32  | 0.25               | *  | 0.89      | ns | 0.84  | 0.03               | ns | 1.04      | ns | 0.94  |
| EV4  | 18.81        | ns | 0.69      | ns | 0.28  | 0.24               | ns | 1.83      | ns | 0.72  | -0.03              | ns | 1.01      | ns | 0.94  |
| EV5  | 4.06         | ns | 0.88      | ns | 0.61  | 0.11               | ns | 1.02      | ns | 0.86  | 0.00               | ns | 1.10      | ns | 0.86  |
| EV6  | 13.04        | ns | 0.59      | ns | 0.36  | 0.11               | ns | 1.05      | ns | 0.78  | 0.03               | ns | 1.01      | ns | 0.96  |
| EV7  | 12.27        | ns | 0.81      | ns | 0.68  | 0.09               | ns | 0.91      | ns | 0.77  | 0.27               | *  | 0.88      | ns | 0.85  |
| EV8  | 9.92         | *  | 0.77      | ns | 0.54  | 0.14               | ns | 0.96      | ns | 0.85  | -0.04              | ns | 1.03      | ns | 0.96  |
| EV9  | 16.15        | ns | 0.38      | ns | 0.20  | 0.07               | ns | 0.96      | ns | 0.89  | 0.76               | ns | 0.96      | ns | 0.88  |
| EV10 | 54.63        | ns | 0.29      | *  | 0.06  | 0.09               | ns | 1.01      | ns | 0.75  | 0.04               | ns | 0.99      | ns | 0.97  |
| EV11 | -1.65        | ns | 0.95      | ns | 0.87  | 0.15               | ns | 0.94      | ns | 0.71  | 0.16               | ns | 0.94      | ns | 0.70  |
| EV12 | 14.13        | ns | 0.56      | ns | 0.33  | -0.05              | ns | 1.00      | ns | 0.86  | 0.03               | ns | 1.01      | ns | 0.96  |
|      |              |    |           |    | 0.44  |                    |    |           |    | 0.81  |                    |    |           |    | 0.90  |

\* Means that the null hypotheses for the intercept ( $H_0: \beta_0=0$ ) and slope ( $H_0: \beta_1=1$ ) were rejected by t-test ( $P=0.05$ ). ns= Not significant. EV= Evaluator. / \*Significa que las hipótesis nulas para el intercepto ( $H_0: \beta_0=0$ ) y pendiente ( $H_0: \beta_1=1$ ) fueron rechazadas por la prueba t ( $P=0.05$ ). ns= No significativo. EV= Evaluador

Regarding the linear regression results, in the evaluation where the scale was not used, the intercept values were greater than one, indicating overestimation of severity by most evaluators. In the case of the slope values, for evaluator 10 (EV10) it was significantly different from 1, however, there

y de 0.70 a 0.97 para la segunda evaluación, con valores de media de 0.81 y 0.90, respectivamente, por lo tanto, las estimaciones fueron precisas (Cuadro 1).

Respecto a los resultados de la regresión lineal, en la evaluación donde no se utilizó la escala, los



was a tendency toward underestimation, with the exception of EV1 and EV11 that showed values closer to 1 (Table 1).

In the initial evaluation employing the scale, the intercept values showed a tendency to overstate disease severity. Specifically, EV3's intercept significantly deviated from 0. As for the slope values, EV4, EV5, EV6 and EV10 showed overestimation compared to the other evaluators. In the second evaluation, EV4 and EV5 demonstrated an underestimation of severity, as reflected by values exceeding 1. Meanwhile, EV1 and EV7 yielded statistically distinct values from 0. Concerning the slope, none of the data exhibited significant differences, although their values closely approximated 1 (Table 1).

In general, concentrating on the evaluations conducted with the scale and considering the null hypotheses ( $H_0: \beta_0=0$  and  $H_0: \beta_1=1$ ), it is observable that  $\beta_0$  maintained proximity to 0 across all evaluators. Likewise,  $\beta_1$  uniformly hovered around 1. This confirms that using the diagrammatic scale of gray mold severity allows obtaining values of precision and accuracy close to those of real severity, even when there are slight tendencies of underestimation and overestimation. This statement is reinforced when comparing the absolute error values of the evaluations, where a decrease in absolute error is observed when using the designed scale (Figure 2).

The combinations of the  $r^2$  values of the evaluations showed that the scales are reproducible. Where the diagrammatic scale was not used, an interval of 0.13 to 0.77, with a mean of 0.44, was obtained. With the scale, the  $r^2$  intervals were 0.72 to 0.91, and 0.76 to 0.97, in the first and second evaluations, respectively, with an overall mean value of 0.85 (Table 2).

The use of diagrammatic scales is efficient in evaluating disease severity in plants (Fantin *et al.*,

valores del intercepto fueron mayores a uno, indicando sobreestimación de la severidad por la mayoría de los evaluadores. En el caso de los valores de la pendiente, para el evaluador 10 (EV10) fue significativamente diferente de 1, sin embargo, hubo tendencia a la subestimación, a excepción de EV1 y EV11 que mostraron valores más cercanos a 1 (Cuadro 1).

Para la primera evaluación donde se utilizó la escala, los valores del intercepto mostraron una tendencia a la sobreestimación de la severidad de la enfermedad, donde para el EV3 fue significativamente diferente de 0. En cuanto a los valores de la pendiente, el EV4, EV5, EV6 y EV10 mostraron sobrestimación con respecto al resto de los evaluadores. En la segunda evaluación, el EV4 y EV5 subestimaron la severidad al obtener valores mayores a 1, por otro lado, para el EV1 y EV7 los valores fueron estadísticamente diferentes de 0. Para el caso de la pendiente, ninguno de los datos mostró diferencia significativa, sin embargo, sus valores fueron cercanos a 1 (Cuadro 1).

En general, tomando énfasis en las evaluaciones donde se utilizó la escala y con base en las hipótesis nulas ( $H_0: \beta_0=0$  y  $H_0: \beta_1=1$ ),  $\beta_0$  presentó valores cercanos a 0 para todos los evaluadores, mientras que para  $\beta_1$  todos estuvieron alrededor de 1, esto confirma que el uso de la escala diagramática de severidad del moho gris permite obtener valores de precisión y de exactitud cercanos a los de severidad real, aun cuando existen ligeras tendencias de subestimación y sobreestimación de los mismos. Esta afirmación se ve reforzada al comparar los valores de error absoluto de las evaluaciones, donde se observa una disminución del mismo al utilizar la escala diseñada en este trabajo (Figura 2).

Las combinaciones de los valores de  $r^2$  de las evaluaciones mostraron que las escalas son reproducibles. En donde no se utilizó la escala diagramática se obtuvo un intervalo de 0.13 a 0.77, con una

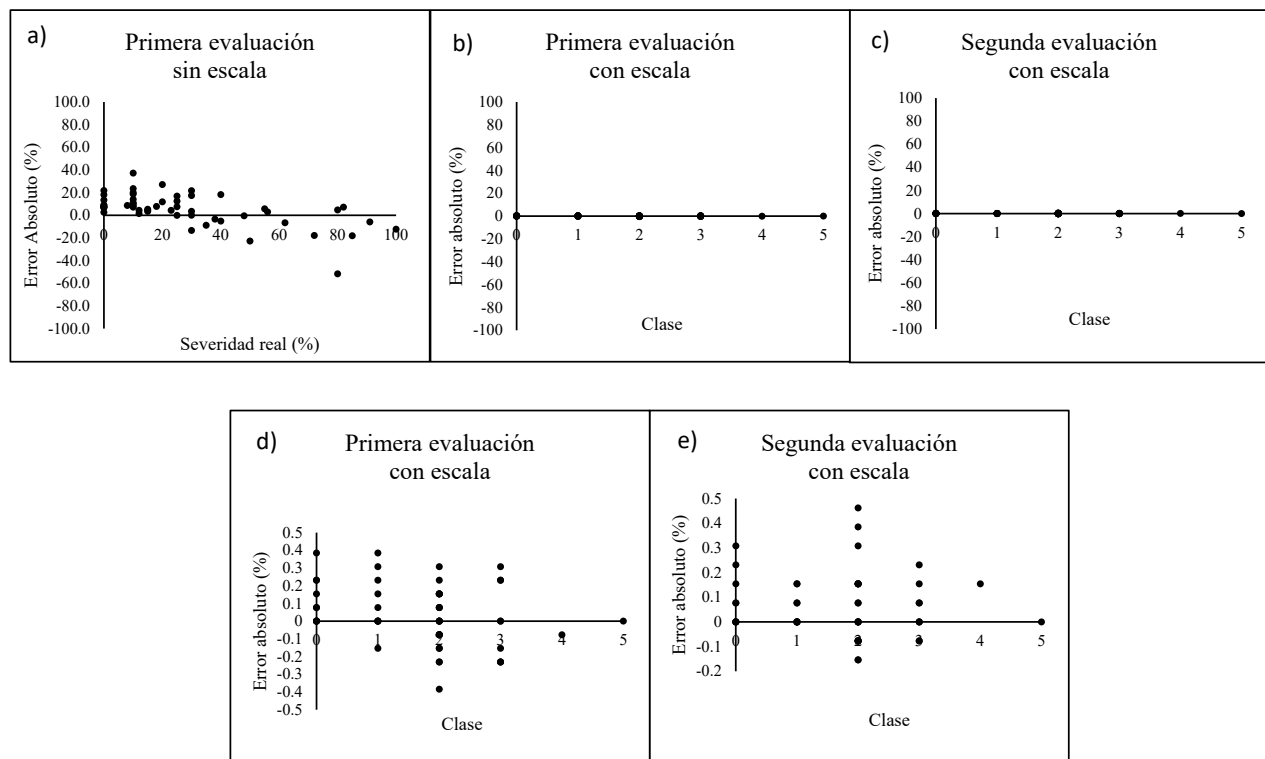


Figure 2. Graphical representation of the absolute error of the estimates of gray mold severity in pomegranate fruits. a) Evaluation carried out without support of the diagrammatic scale, b) and c) Evaluations carried out with support of the diagrammatic scale, d) and e) Representation of b) and c) at a smaller scale of absolute error.

Figura 2. Representación gráfica del error absoluto de las estimaciones de la severidad del moho gris en frutos de granada. a) evaluación realizada sin apoyo de la escala diagramática, b) y c) evaluaciones realizadas con apoyo de la escala diagramática. d) y e) representación de los incisos b) y c) a menor escala del error absoluto.

2018). Recently, the presence of gray mold caused by *B. cinerea* on pomegranate fruits in Mexico was reported (Patricio-Hernández *et al.*, 2023), and to our knowledge, a diagrammatic scale for evaluating the severity of this disease has not been officially reported. The scale developed in the present investigation allows reliable evaluation of the severity of this disease with greater precision and accuracy. When the scale was not used, the average  $r^2$  value was 0.44, while in the first and second evaluations with the scale, averages of 0.81 and 0.90 were obtained, respectively. This represents a significant increase, agreeing with

media de 0.44. Con las escalas, los intervalos de  $r^2$  fueron de 0.72 a 0.91, y de 0.76 a 0.97, en la primera y segunda evaluación, respectivamente, con un valor medio global de 0.85 (Cuadro 2).

El uso de escalas diagramáticas es eficiente en la evaluación de la severidad de las enfermedades en plantas (Fantin *et al.*, 2018). Recientemente se reportó la presencia de moho gris causado por *B. cinerea* en frutos de granada en México (Patricio-Hernández *et al.*, 2023), y hasta donde se sabe no se ha reportado oficialmente una escala diagramática para evaluar la severidad de dicha enfermedad. La escala desarrollada en la presente investigación,

**Table 2. Coefficient of determination ( $r^2$ ) of linear regression equations relating paired evaluator estimates of gray mold severity caused by *B. cinerea* on pomegranate fruit. Comparisons are made between evaluations done without use of the scale, versus the first and second evaluations where the scale was used.**

**Cuadro 2. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las ecuaciones de regresión lineal que relacionan entre evaluadores pareados las estimaciones de la severidad del moho gris causada por *B. cinerea* en frutos de granada sin el uso de la escala, en contraste con la primera y segunda evaluación en donde si se usó el mismo.**

| Evaluación sin escala         | EV2  | EV3  | EV4  | EV5  | EV6  | EV7  | EV8  | EV9  | EV10 | EV11 | EV12 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| EV1                           | 0.52 | 0.50 | 0.48 | 0.64 | 0.52 | 0.68 | 0.61 | 0.44 | 0.37 | 0.77 | 0.50 |
| EV2                           |      | 0.34 | 0.32 | 0.49 | 0.36 | 0.52 | 0.45 | 0.28 | 0.21 | 0.62 | 0.35 |
| EV3                           |      |      | 0.30 | 0.46 | 0.34 | 0.50 | 0.43 | 0.26 | 0.19 | 0.59 | 0.32 |
| EV4                           |      |      |      | 0.45 | 0.32 | 0.48 | 0.41 | 0.24 | 0.17 | 0.57 | 0.30 |
| EV5                           |      |      |      |      | 0.49 | 0.64 | 0.57 | 0.40 | 0.33 | 0.74 | 0.47 |
| EV6                           |      |      |      |      |      | 0.52 | 0.45 | 0.28 | 0.21 | 0.62 | 0.35 |
| EV7                           |      |      |      |      |      |      | 0.61 | 0.44 | 0.37 | 0.77 | 0.50 |
| EV8                           |      |      |      |      |      |      |      | 0.37 | 0.30 | 0.70 | 0.43 |
| EV9                           |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.13 | 0.53 | 0.26 |
| EV10                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.46 | 0.19 |
| EV11                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.60 |
| Primera evaluación con escala |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| EV1                           | 0.83 | 0.89 | 0.83 | 0.90 | 0.86 | 0.85 | 0.89 | 0.91 | 0.84 | 0.82 | 0.90 |
| EV2                           |      | 0.78 | 0.72 | 0.79 | 0.75 | 0.75 | 0.78 | 0.80 | 0.74 | 0.72 | 0.79 |
| EV3                           |      |      | 0.78 | 0.85 | 0.81 | 0.81 | 0.84 | 0.87 | 0.80 | 0.78 | 0.85 |
| EV4                           |      |      |      | 0.79 | 0.75 | 0.75 | 0.78 | 0.80 | 0.74 | 0.72 | 0.79 |
| EV5                           |      |      |      |      | 0.82 | 0.82 | 0.85 | 0.87 | 0.81 | 0.79 | 0.86 |
| EV6                           |      |      |      |      |      | 0.78 | 0.81 | 0.83 | 0.77 | 0.75 | 0.82 |
| EV7                           |      |      |      |      |      |      | 0.81 | 0.83 | 0.76 | 0.74 | 0.82 |
| EV8                           |      |      |      |      |      |      |      | 0.87 | 0.80 | 0.78 | 0.85 |
| EV9                           |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.82 | 0.80 | 0.87 |
| EV10                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.73 | 0.81 |
| EV11                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.79 |
| Segunda evaluación con escala |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| EV1                           | 0.87 | 0.88 | 0.88 | 0.84 | 0.89 | 0.84 | 0.89 | 0.85 | 0.90 | 0.76 | 0.89 |
| EV2                           |      | 0.93 | 0.93 | 0.89 | 0.94 | 0.88 | 0.94 | 0.90 | 0.94 | 0.81 | 0.94 |
| EV3                           |      |      | 0.94 | 0.90 | 0.95 | 0.90 | 0.95 | 0.91 | 0.96 | 0.82 | 0.95 |
| EV4                           |      |      |      | 0.90 | 0.95 | 0.90 | 0.95 | 0.91 | 0.96 | 0.82 | 0.95 |
| EV5                           |      |      |      |      | 0.91 | 0.86 | 0.91 | 0.87 | 0.92 | 0.78 | 0.91 |
| EV6                           |      |      |      |      |      | 0.91 | 0.96 | 0.92 | 0.97 | 0.83 | 0.96 |
| EV7                           |      |      |      |      |      |      | 0.91 | 0.87 | 0.91 | 0.78 | 0.91 |
| EV8                           |      |      |      |      |      |      |      | 0.92 | 0.97 | 0.83 | 0.96 |
| EV9                           |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.93 | 0.79 | 0.92 |
| EV10                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.84 | 0.97 |
| EV11                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 0.83 |

EV= Evaluator. / EV= Evaluador.

what was observed by Belan *et al.* (2014), who obtained  $r^2$  values of 0.89 and 0.87 in the first and second evaluations, respectively, when using their designed scale for coffee tree leaf spot.

The  $r^2$  values of the present investigation were significantly higher in the evaluations where the scale was used. This is similar to those reported by Frago-Benhumea *et al.* (2022), who obtained values of 0.90 to 0.97, with a mean of 0.93 when evaluating the severity of rust (*Uromyces viciae-fabae*) in the broad bean crop, with and without the use of diagrammatic scales. They concluded that this value improves with the use of diagrammatic scales. This indicates that the designed scale can be used in the field, since it has precision values ( $r^2$ ) close to 1 in the evaluations.

Several studies have shown a tendency to overestimate (Figueiredo *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2021) and to a lesser extent underestimate (Braga *et al.*, 2020) when diagrammatic scales are not used. In the present work, overestimates were observed in most of the absolute data when the diagrammatic scale was not used, in contrast to the evaluations where it was used. This behavior may be due to visual stimuli, such as similar colorations in the lesions that are not considered for the evaluation of severity, as reported by Perina *et al.* (2019). They identified factors that can lead to overestimation of the severity of brown spot on leaves of *Citrus reticulata* caused by *Alternaria* sp. due to the presence of different pigments on the leaf surface that do not correspond to the evaluated disease. This can affect both experienced and inexperienced evaluators.

The use of the scale allowed a considerable decrease in the absolute error of the evaluations, compared to when it was not used (without the scale it was from -59 to 39%, with the scale it was from -0.4 to 0.4% and -0.16 to 0.48% in the first and second evaluations, respectively). Similar

permite evaluar la severidad de esta enfermedad de manera confiable con una mayor precisión y exactitud. Cuando no se utilizó la escala, el valor promedio de  $r^2$  fue de 0.44 mientras que en la primera y segunda evaluación con la escala se obtuvo un promedio de 0.81 y 0.90, respectivamente, lo que representa un incremento significativo, esto concuerda con lo observado por Belan *et al.* (2014), quienes obtuvieron valores de  $r^2$  de 0.89 a 0.87 en la primera y segunda evaluación, respectivamente, al utilizar la escala que ellos diseñaron para el manchado foliar del café.

Los valores de  $r^2$  de la presente investigación fueron significativamente mayores en las evaluaciones donde se utilizó la escala, lo cual se asemeja a lo reportado por Frago-Benhumea *et al.* (2022), (0.90 a 0.97, con media de 0.93) quienes evaluaron la severidad de la roya (*Uromyces viciae-fabae*) en el cultivo de haba, con y sin la utilización de escalas diagramáticas, concluyendo que dicho valor mejora con el uso de escalas diagramáticas. Esto es un indicativo de que la escala diseñada puede ser utilizada en campo, al poseer valores de precisión ( $r^2$ ) cercanos a 1 en las evaluaciones.

En diversos estudios se ha observado la tendencia a la sobreestimación (Figueiredo *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2021) y en menor medida a la subestimación (Braga *et al.*, 2020) cuando no se utilizan escalas diagramáticas. En el presente trabajo se observaron sobreestimaciones en la mayoría de los datos absolutos cuando no se hizo uso de la escala diagramática, en contraste, con las evaluaciones donde sí se utilizó. Este comportamiento puede deberse a estímulos visuales, tales como coloraciones similares en las lesiones que no son consideradas para la evaluación de la severidad, tal y como lo reporta Perina *et al.* (2019), quienes identifican los factores que pueden llevar a la sobre estimación de la severidad de la mancha marrón sobre hojas de *Citrus reticulata* ocasionada por *Alternaria* sp., por

results were obtained by Muños-Arias *et al.* (2020) for gray mold on *Rubus glaucus*, where this value decreased with use of the diagrammatic scale (from -30 to 30% without the scale to -20 to 20% with the scale). On the other hand, Ortega-Acosta *et al.* (2016) and Nutter Jr and Schultz (1995) mention that absolute error values less than 5% are considered acceptable. In this work, results of -0.35 to 0.5% were obtained on average for the two evaluations, which supports the accuracy of the evaluations when using the scale. Thus, the present research provides a reliable instrument for evaluating the severity induced by gray mold in pomegranate fruits.

When  $r^2$  values among evaluators were compared, it was evident that the designed scale exhibited precision, evident in its capacity to narrow the variation intervals within comparisons when employing the diagrammatic scale. This particular methodology enabled the accurate, precise, and reproducible estimation of gray mold severity attributed to *B. cinerea* on pomegranate fruits. As a result, the scale holds the potential to serve as an effective tool for disease management, monitoring, and surveillance purposes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) for the grant awarded to Alberto Patricio Hernández, and the participants who served as evaluators for this work.

#### CITED LITERATURE

- Alam MW, Rehman A, Ahmad S, Sarwar M, Naseem MK, Chattha MB, Malik AU and Ali S. 2018. First report of *Botrytis cinerea* causing postharvest fruit rot on stored pomegranates in Pakistan. Plant Disease 103:374-374. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1114-PDN>
- Bardas GA, Tzelepis GD, Lotos and Karaoglanidis GS. 2009. First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold of pomegranate (*Punica granatum*) in Greece. Plant Disease 93:1346-1346. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1346C>

la presencia de pigmentos diferentes en la superficie del órgano que no corresponden a la enfermedad evaluada, esto puede afectar a evaluadores con y sin experiencia.

El uso de la escala, permitió disminuir considerablemente el error absoluto de las evaluaciones, con respecto a donde no se utilizó (sin la escala fue de -59 a 39%, con la escala fue de -0.4 a 0.4% y -0.16 a 0.48% en la primera y segunda evaluación, respectivamente). Resultados similares fueron obtenidos por Muños-Arias *et al.* (2020) para el moho gris en *Rubus glaucus*, donde el valor de este parámetro disminuyó por el uso de la escala diagramática (de -30 a 30% sin la escala a -20 a 20% con la escala). Por otro lado, Ortega-Acosta *et al.* (2016) y Nutter Jr y Schultz (1995), mencionan que valores menores al 5% del error absoluto, son considerados aceptables. En este trabajo se obtuvieron en promedio para las dos evaluaciones resultados de -0.35 a 0.5%, lo cual apoya la exactitud de las evaluaciones al utilizar la escala, por lo que la presente investigación aporta un instrumento confiable para la evaluación de la severidad inducida por el moho gris en frutos de granada.

Al comparar los valores de  $r^2$  entre evaluadores, se observó que la escala diseñada es precisa al reducir los intervalos de variación entre comparaciones al utilizar la escala diagramática, la cual permitió estimar la severidad del moho gris ocasionado por *B. cinerea* sobre frutos de granada, de manera exacta, precisa y reproducible, por lo que puede ser empleada como herramienta en el manejo, el seguimiento y el monitoreo de la enfermedad.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada a Alberto Patricio Hernández, y a los participantes que fungieron como evaluadores en este trabajo.

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

- Behzad N, Seyed-Saeid S and Shahin R. 2020. Quality detection of pomegranate fruit infected with fungal disease. *International Journal of Food Properties* 23:9-21. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1705851>
- Belan LL, Pozza EA, Freitas MLO, Souza RM, Jesús Junior WC and Oliveira JM. 2014. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. *Journal of Phytopathology* 162:801-810. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12272>
- Braga K, Fantin LH, Roy JMT, Canteri MG and Paiva AM. 2020. Development and validation of a diagrammatic scale for the assessment of the severity of bacterial leaf streak of corn. *European Journal of Plant Pathology* 157:367-375. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02008-7>
- Da silva GCBM, Pio R, Pereira RCM, Peche PM and Pozza EA. 2019. Development and validation of a severity scale for assessment of fig rust. *Phytopathologia Mediterranea* 58:597-605. <http://dx.doi.org/10.14601/Phyto-10967>
- Fantin LH, Braga K, Canteri MG and Borges EP. 2018. Development and validation of diagrammatic scale to assess target spot severity in cotton. *Australasian Plant Pathology* 47:491-497. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0576-6>
- Figueiredo Y, Oliveira JM, Almeida KA, Pereira PF, Pedroso LA, Guimaraes MRF, Moreira-Costa M and Ampélio-Pozza E. 2022. Coffee leaf rust assessment: comparison and validation of diagrammatic scales for *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology* 164:411-427. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02570-2>
- Fragoso-Benhumea JM, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildózola A, Franco-Mora O, Gutiérrez-Ibáñez AT, Contreras-Rendón A and García-Velasco R. 2022. Diagrammatic scale for rust severity assessment in broad bean (*Vicia faba*). *Mexican Journal of Phytopathology* 40(3): 474-482. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-2>
- French E y Hebert T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. IICA, San José Costa Rica, p.289.
- Ge S, Dou L, Wang J, Zhula G, Yang J, Li Z and Tu Y. 2021. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology* 271:113877. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113877>.
- Horsfall JG and Cowling EB. 1978. Pathometry: the measurement of plant disease Pp:119-136. *In*: Horsfall JG and Cowling EB (eds.). London UK. How disease develops in populations. Elsevier. London UK. 407p.
- Koba K and Yanagita. 2011. Potential health benefits of pomegranate (*Punica granatum*) seed oil containing conjugated linolenic acid. Pp:919-924. *In*: Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Academic Press. United States of America. 2607p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10108-2>
- Mora-Aguilera G and Acevedo-Sánchez G. 2018. DOSLOG 2.0v. Laboratorio de análisis de riesgo epidemiológico fitosanitario (CP –LANREF). Montecillo, Texcoco, México
- Muñoz-Arias S, Guerrero-Álvarez GE and González-Patiño PA. 2020. Diagrammatic scale for measuring severity of gray mould in thornless Castilla blackberry (*Rubus glaucus* Benth). *Ciencia Rural* 50:1678-4596. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190859>
- Nutter Jr. FW, Esker PD and Coelho-Netto RA. 2006. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology* 115:95-103. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Nutter FW and Schultz PM. 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17:174–184.
- Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Hernández-Ruiz J. 2016. Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle. *Mexican Journal of Phytopathology* 34:270-285. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-6>
- Patricio-Hernández A, Moreno-Velázquez M, Quezada-Salinas A and Mercado-Flores Y. 2023. First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00715-x>
- Pereira RCM, de Oliveira LM, Tassone GAT, Rego GMS and Poza EA. 2021. Diagrammatic scale for *phyllachora* in Australian red cedar. *Australasian Plant Pathology* 50:81–90. <https://doi.org/10.1007/s13313-020-00749-x>
- Perina FJ, Belan LL, Moreira SI, Nery EM, Alves E and Posa EA. 2019. Diagrammatic scale for assessment of *Alternaria* brown spot severity on tangerine leaves. *Journal of Plant Pathology* 101:981–990. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00306-6>
- Richard B, Qi A and Fitt B. 2021. Control of crop diseases through Integrated Crop Management to deliver climate-smart farming systems for low- and high-input crop production. *Plant Pathology* 71:187-206. <https://doi.org/10.1111/ppa.13493>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Estadística de Producción Agrícola. Sistema de Información Agrícola y Pesquera. http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php (Consulta, septiembre 2021).
- Vereschuk ML, Dominguez FG, Alvarenga AE and Zapata PD. 2022. Diagrammatic scale for quantification of severity of white thread blight disease in yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire). *Crop Science* 94:e20201931. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220201931>